

Identifizierung und Charakterisierung von Oberflächenproteinen des Gram-positiven Bakteriums *Listeria monocytogenes*

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Jessica Schaumburg

aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Dr. Singh Chatwal

eingereicht am: 23.01.2003

mündliche Prüfung (Dissertation) am: 24.03.2003

2003
(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor oder Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Schaumburg, J., Kärst, U., Wehland, J.: Identifizierung neuer zellwand- und membrangebundener Proteine von *Listeria monocytogenes*. (Poster). Tagung der DECHEMA, Frankfurt (2000).

Schaumburg, J., Kärst, U., Wehland, J.: Identification of new proteins associated with the cell wall of *Listeria monocytogenes*. (Poster). ISOPOL Meeting, Mannheim (2001).

Schaumburg, J., Baumgärtner, M., Kärst, U., Wehland, J.: Cell wall and secretory proteins of *Listeria monocytogenes*. (Poster). VAAM-Tagung, Göttingen (2002).

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1.1. Infektionszyklus	2
1.1.2. Oberflächenproteine	4
1.2. Proteomanalyse	6
1.3. Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Allgemeines Material und Chemikalien	14
2.2. Allgemeine Puffer	14
2.3. Kultivierung von Bakterien	14
2.3.1. Verwendete Bakterienstämme	14
2.3.2. Kulturmedien und Antibiotika	15
2.4. Kultur von Gewebezellen	16
2.4.1. Medien und Zusätze	16
2.4.2. Zellen und Kulturbedingungen	16
2.5. Infektion von Gewebekulturzellen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	18
2.5.1. Immunfluoreszenzmikroskopie	18
2.5.2. Immunfluoreszenzaufnahmen fixierter Zellen	20
2.5.3. Gentamycinassay	21
2.6. Herstellung von Oberflächeproteinextrakten	21
2.6.1. Extraktion von zellwand-assoziierten Proteinen (serielle Extraktion)	21
2.6.2. Endolytische Protoplastierung	22
2.6.3. Aminopeptidase-Test (PepC-Test)	23
2.7. Allgemeine biochemische Methoden	23
2.7.1. TCA/Acetonfällung	23
2.7.2. Proteinbestimmung nach Bradford	24
2.7.3. SDS-PAGE	24

2.7.4. Proteinfärbungen	25
2.7.4.1. Silberfärbung	25
2.7.4.2. Färbung mit Coomassie brilliant blue	26
2.7.4.3. Kolloidale Coomassie-Färbung (Neuhoff-Färbung)	27
2.7.4.4. RuBPS-Färbung	27
2.7.5. Westernblot	28
2.7.6. Immunfärbung und Chemolumineszenz	28
2.7.7. N-terminale Sequenzierung	29
2.7.8. Affinitätschromatographie (FPLC)	29
2.8. Zweidimensionale Gelelektrophorese	30
2.8.1. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	30
2.8.2. Äquilibration	31
2.8.3. SDS-PAGE (2. Dimension)	32
2.9. Massenspektrometrie	33
2.9.1. Verdau der Proteine und Elution der Peptide	33
2.9.2. Guanidinierung	34
2.9.3. Aufreinigen und Entsalzen der peptide („zipptippen“)	34
2.9.4. MALDI-TOF	34
2.9.5. ESI-Q-TOF	35
2.9.6. Auswertung der Massenspektren	36
2.10. Molekularbiologische Methoden	37
2.10.1. Plasmide	37
2.10.2. Oligonukleotide	38
2.10.3. Polymerasekettenreaktion	38
2.10.4. TOPO-TA-Klonierung	39
2.10.5. DNA-Agarosegelelektrophorese	39
2.10.6. DNA-Restriktionsverdau	40
2.10.7. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	41
2.10.8. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	41
2.10.9. Ligation	42
2.10.10. Transformation in <i>E. coli</i>	42
2.10.11. Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)	43
2.10.12. DNA-Sequenzierung	43
2.11. Herstellung polyklonaler Antikörper	44

2.11.1. Immunisierung	44
2.11.2. Aufreinigung polyklonaler Seren	45
2.12. Herstellung monoklonaler Antikörper	46
2.12.1. Immunisierung	46
2.12.2. Zellfusion	46
2.12.3. ELISA	47
2.12.4. Subklonierung	48
2.12.5. Subklassentest	48
2.12.6. Massenkultivierung von Hybridomzellen	49
2.13. Blau Native Gelelektrophorese (BN)	49
2.13.1. Herstellung von Membranextrakten und Probenvorbereitung für BN	49
2.13.2. Blau Native Gelelektrophorese (1. Dimension)	50
2.13.3. Tricin-Gelelektrophorese (2. Dimension)	51
2.14. Radioaktives Markieren von Lipoproteinen	52
3. Ergebnisse	53
3.1. Identifizierung von Oberflächenproteinen von <i>Listeria monocytogenes</i>	53
3.1.1. Serielle Extraktion Zellwand-assoziiierter Proteine	53
3.1.2. Kartierung des Subproteoms der Zellwand-assoziierten Proteine	56
3.1.3. Isolierung von Zellwandproteinen durch endolytische Protoplastierung	61
3.1.4. Kartierung des Subproteoms der Zellwandproteine	62
3.1.5. Etablierung des AminopeptidaseC-Tests zum Ausschluss einer zytoplasmatischen Verunreinigung der Oberflächenproteinextrakte	65
3.2. Analyse von P70	67
3.2.1. Untersuchung des Genlocus von P70	67
3.2.2. Untersuchung der Aminosäuresequenz von P70	68
3.2.3. Herstellung von Antikörpern gegen P70	71
3.2.4. Klonierung von P70	72
3.3. Identifikation putativ PrfA-regulierter Proteine	74
3.4. Analyse von Alp	77
3.4.1. Untersuchung des Genlocus von Alp	78
3.4.2. Untersuchung der Aminosäuresequenz von Alp	79
3.4.3. Herstellung von Antikörpern gegen Alp	81
3.4.4. Charakterisierung einer Alp-Deletionsmutante	83

3.4.4.1. Wachstumskurve	84
3.4.4.2. Infektion	85
3.4.4.3. Expressionsanalyse durch Proteomics	89
3.4.5. Charakterisierung einer Lipidmodifikation von Alp	92
3.4.6. Affinität von Alp zu zweiwertigen Ionen	93
3.4.7. Weitere Bestandteile des ABC-Transporters	94
3.4.8. Klonierung, Expression und Aufreinigung von Alp	95
3.4.8.1. <i>E. coli</i> -pGEX-Ansatz	96
3.4.8.2. <i>E. coli</i> -Ansatz ohne TAG	99
3.4.8.3. Listerien-His-TAG-Ansatz	100
4. Diskussion	102
4.1. Methodenentwicklung	103
4.2. Identifikation neuer Oberflächenproteine	105
4.3. P70	113
4.4. Alp	114
4.5. Funktionelle Genomanalyse durch Proteomforschung	117
4.6. Ausblick	119
5. Zusammenfassung	121
6. Literatur	122
7. Danksagung	134
8. Anhang	135

Abkürzungen und Fachbegriffe

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
A	Adenin
ABC	ATP-Binde-Cassette
ActA	Aktin-Nukleationsfaktor
Ak	Antikörper
Alp	Adhäsion-ähnliches Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	brain heart infusion
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CCD	charge-coupled-device
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GW	Aminosäuremotiv aus Glycin-Tryptophan
h	Stunde(n)
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
L	Liter
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LPXTG	Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin
M	Molar
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
mM	Millimolar
mL	Milliliter
MEM	Minimal Essential Medium
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen in DNA-Sequenz
P70	Protein 70
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
protrusions	eine durch <i>L. monocytogenes</i> hervorgerufene Zellausstülpung
Q	Quadropol

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	N, N, N, N-tetramethyl-ethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TOF	Flugzeit (time of flight)
U	Einheit (unit)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

	Seite
1.1 Schematische Darstellung des zentralen Virulenzgenclusters von <i>L. monocytogenes</i> .	2
1.2 Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i> .	3
1.3 Modell der Zellwand und Zytoplasmamembran mit den verschiedenen Oberflächenproteinen bei Gram-positiven Bakterien.	5
1.4 Schematische Darstellung der Bausteine der funktionellen Genomanalyse.	7
1.5 Peptidmassenfingeraabdruck	9
1.6 Zirkuläre Genomkarte von <i>L. monocytogenes</i> EGDe und <i>L. innocua</i> CLIP11262.	11
2.1 Schematische Darstellung eines MALDI-Massenspektrometers (A) und des Prinzips der Ionisierung und Flugzeitmessung (B).	35
2.2 Schematische Darstellung eines Q-TOF Massenspektrometers (A) und der Mikrosequenzierung einzelner Peptide.	36
3.1 Serielle Extraktion von zellwandassoziierten Proteinen von <i>L. monocytogenes</i> .	54
3.2 Kartierung der zellwand-assoziierten Proteine von <i>L. monocytogenes</i> nach Extraktion mit Tris.	57
3.3 Kartierung der zellwand-assoziierten Proteine von <i>L. monocytogenes</i> nach Extraktion mit KSCN.	59
3.4 Mikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast) der Protoplastierung von <i>L. monocytogenes</i> durch das Phagenlysin 511 nach 5, 10 und 20 Minuten.	61
3.5 Kartierung des Zellwand-Subproteoms von <i>L. monocytogenes</i> .	64
3.6 Enzymatische Umsetzung von Arginin-p-Nitroaniliden durch Aminopeptidase C in verschiedenen Extrakten von <i>L. monocytogenes</i> .	65
3.7 Schematische Darstellung der Region um <i>lmo2691</i> in Genom von <i>L. monocytogenes</i> .	67
3.8 Aufbau des Proteins P70 und verwandter Proteine.	68
3.9 Sequenzvergleich des Proteins P70 von <i>L. monocytogenes</i> .	69
3.10 Übersicht und Charakterisierung ausgewählter Klone der Fusion zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen P70.	71
3.11 Test der monoklonalen Antikörper gegen Protein P70 von <i>L. monocytogenes</i> .	72

3.12 Identifikation putativ PrfA-regulierter Proteine der zellwand-assoziierten Fraktion nach Tris- und KSCN-Extraktion.	74
3.13 Expressionsmuster von Alp in eindimensionalen SDS-Gelen.	77
3.14 Schematische Darstellung der Region um <i>lmo1847</i> im Genom von <i>L. monocytogenes</i> .	78
3.15 Darstellung der Signalpeptidsequenz von Alp.	80
3.16 Ergebnis der Homologiesuche mit der Sequenz von Alp.	80
3.17 Detektion von Alp mit dem polyklonalen Antikörper α alp2 im Westernblot.	82
3.18 Vereinfachte Darstellung der Deletionsmutante $\Delta lmo1847$ von <i>L. monocytogenes</i> im Vergleich zum Wildtyp.	83
3.19 Wachstumskurve von <i>L. monocytogenes</i> Wildtyp und $\Delta lmo1847$ in BHI-Medium bei 37, 25 und 5 °C.	84
3.20 Box-Whisker-Plot der Invasivität von <i>L. monocytogenes</i> EGD Wildtyp und $\Delta lmo1847$ in Verozellen.	85
3.21 Intrazelluläres Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD Wildtyp und $\Delta lmo1847$ nach Infektion in Verozellen.	86
3.22 Intrazelluläres Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD Wildtyp und $\Delta lmo1847$ nach Infektion in HeLa-Zellen.	87
3.23 Intrazelluläres Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD Wildtyp und $\Delta lmo1847$ nach Infektion in Ptk2-Zellen.	87
3.24 Intrazelluläre Fortbewegung von <i>L. monocytogenes</i> EGD Wildtyp und $\Delta lmo1847$ in Verozellen.	88
3.25 Differentielle Expression in 2D-Gelen von Tris-Extrakten von <i>L. monocytogenes</i> .	89
3.26 Differentielle Expression in 2D-Gelen von KSCN-Extrakten von <i>L. monocytogenes</i> .	90
3.27 Detektion von Lipoproteinen durch Einbau ^3H -markierter Palmitinsäure.	92
3.28 Bindung zwischen Metallionen und Zellwandproteinen.	93
3.29 Detektion von Alp in Metallchelate-Experimenten.	94
3.30 Auftrennung von Membranproteinextrakten durch Blau Native Gelelektrophorese.	95
3.31 Expression von GST-Fusionsprotein in <i>E. coli</i> BL21.	96

3.32 Westernblot der Alp-überproduzierenden Klone.	97
3.33 GST-Fusionsproteinaufreinigung des Klons 111.	98
3.34 Westernblot der GST-Fusionsproteinaufreinigung des Klons 512.	98
3.35 Alp-Expression und Aufreinigung in <i>E. coli</i> BL21 durch pMW172.	99
3.36 SDS-Gel und Westernblot der ausgefallenen und löslichen HPLC-Fraktionen des Klons 5.	100
4.1 Theoretisches Proteom von <i>L. monocytogenes</i> .	112
4.2 Vergleich bekannter PrfA-Promotoren mit dem putativen PrfA-Promotor von $\Delta lmo1847$.	114
4.3 Vergleich der SigB-Promotoren von <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> mit dem SigB-Promotor von <i>L. monocytogenes</i> und der putativen SigB-Bindestelle von $\Delta lmo1847$	115

Tabellenverzeichnis

	Seite
3.1: Aus Oberflächenproteinextrakten identifizierte Proteine von <i>L. monocytogenes</i>	55
3.2: Identifizierte Proteinspots aus 2D-Gelen der Zellwand-assoziierten Fraktion nach Tris-Extraktion.	58
3.3: Identifizierte Proteinspots aus 2D-Gelen der Zellwand-assoziierten Fraktion nach KSCN-Extraktion.	60
3.4: Identifizierte Proteinspots aus 2D-Gelen der Zellwandfraktion nach endolytischer Protoplastierung.	63
3.5: Identifizierte putativ PrfA-regulierte Proteine aus Gelen der Zellwand-assoziierten Proteine nach Tris-Extraktion.	75
3.6: Identifizierte putativ PrfA-regulierte Proteine aus Gelen der Zellwand-assoziierten Proteine nach Tris-Extraktion.	76
3.7: Differenziell exprimierte Proteine in der Deletionsmutante $\Delta lmo1847$ im Vergleich zum Wildtyp von <i>L. monocytogenes</i> .	90
3.8: Differenziell exprimierte Proteine in der Deletionsmutante $\Delta lmo1847$ im Vergleich zum Wildtyp von <i>L. monocytogenes</i> .	91
4.1: Einteilung der proteinkodierenden Gene von <i>L. monocytogenes</i> in funktionelle Kategorien.	106
4.2: Identifizierte Oberflächenproteine von <i>L. monocytogenes</i> .	135
8.1: Übersicht aller in dieser Arbeit identifizierten Proteine:	

1. EINLEITUNG

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listerien sind Gram-positive, nicht-sporulierende Stäbchenbakterien, die ubiquitär im Boden und Wasser vorkommen. Zur Gattung *Listeria* gehören 6 Arten, die apathogenen Arten *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welsheri*, *L. grayi*, sowie die fakultativ pathogenen Arten *L. ivanovii* und *L. monocytogenes*. Während *L. ivanovii* Tiere infiziert, verursacht *L. monocytogenes* beim Menschen ernsthafte Erkrankungen (Listeriose). Vor allem immungeschwächte Personen wie z.B. AIDS- oder Transplantationspatienten, alte Menschen und Neugeborene erkranken an Listeriose. Grundsätzlich existiert eine wirkungsvolle Therapie gegen diese Erkrankung, doch oft werden die ersten grippeähnlichen Symptome verkannt und fortgeschrittenen Infektionen führen häufig zu Todesfällen. So wurden z. B. in dem Zeitraum 1985-1991 in den USA 2500 Listerioseerkrankungen mit 500 Todesfällen jedes Jahr gemeldet (US Department of Health and Human Services, 2001). Im Vergleich dazu traten jährlich 13.056 Salmonellen-Infektionen mit 50 Todesfällen auf (Mishu *et al.*, 1994). Der Übertragungsweg von *L. monocytogenes* findet in den meisten Fällen durch kontaminierte Lebensmittel statt. Eine Aufnahme erfolgt über das Darmepithel oder Makrophagen, wodurch *L. monocytogenes* in den Blutkreislauf gelangt. Von dort aus kann es sämtliche Organe infizieren und als fakultativ intrazellulärer Erreger sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Plazentaschranke überwinden und somit Hirnhautentzündungen und Schädigungen des Embryos hervorrufen. Als Lebensmittelkeim stellt *L. monocytogenes* durch seine speziellen Eigenschaften ein großes Problem für die Nahrungsmittelindustrie dar. Es zeichnet sich durch die Vermehrungsfähigkeit bei niedrigen Temperaturen extremen pH-Werten und hohen Salzkonzentrationen aus und kann so bei herkömmlichen Konservierungsmethoden noch überleben.

Um neue Therapiemöglichkeiten oder Diagnoseverfahren für eine Listerien-Erkrankung zu entwickeln, ist eine Aufklärung der molekularen Pathogenitätsmechanismen wichtig. Nur ein detailliertes Wissen über Funktion und Regulation der Infektionsprozesse ermöglicht gezielte Eingriffe durch Medikamente oder die Entwicklung eines Impfstoffes für eine dauerhafte Bekämpfung des Bakteriums.

Darüber hinaus dient *L. monocytogenes* als Modellorganismus für fakultativ intrazelluläre Erreger und erbrachte wesentliche Beiträge für die Pathogenitätsforschung.

1.1.1 Infektionszyklus

L. monocytogenes ist ein fakultativ intrazellulärer Erreger. Essentiell für die Pathogenität sind sechs auf dem Chromosom hintereinanderliegende Virulenzgene (Abbildung 1.1), welche dem apathogenem Stamm *L. innocua* fehlen. Ein zentraler Regulator dieser Gene und weiterer Virulenzfaktoren ist der positive Regulationsfaktor PrfA, der temperaturabhängig exprimiert wird und autoregulatorisch wirkt. Um neben Makrophagen auch nicht-phagozytierende Zellen, wie Epithelzellen und Fibroblasten, infizieren zu können, besitzt *L. monocytogenes* weitere spezifische Virulenzfaktoren.

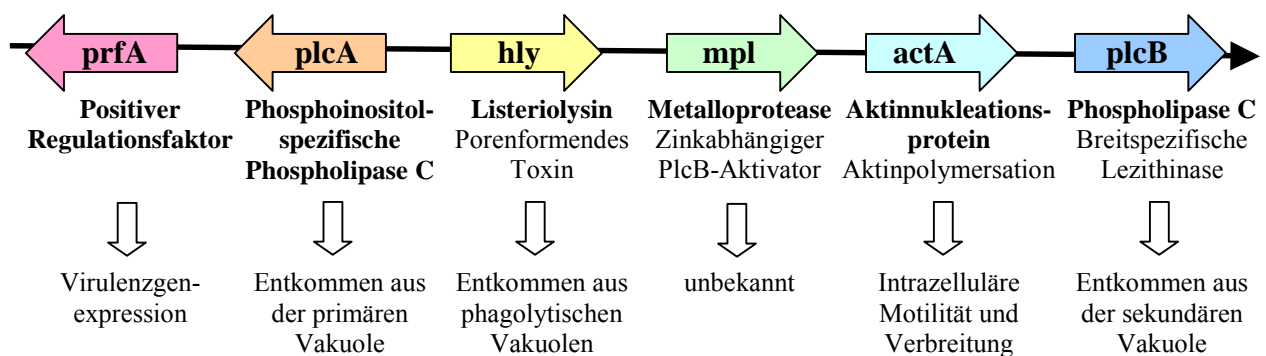


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des zentralen Virulenzgenclusters von *L. monocytogenes*. Gezeigt sind die molekularen Mechanismen und ihre Rollen dieser essentiellen Virulenzfaktoren im Infektionszyklus.

Der charakteristische Infektionszyklus wurde 1989 von Tilney und Portney beschrieben und ist schematisch in der Abbildung 1.2 dargestellt. In nicht-phagozytierenden Zellen induziert *L. monocytogenes* seine eigene Phagozytose durch die Internaline A und B, die die Adhäsion und Invasion durch spezifische Bindung an Wirtszellproteine einleiten (Gaillard *et al.*, 1991, Dramsi *et al.*, 1993, Lingnau *et al.*, 1995). *L. monocytogenes* liegt nach der Invasion in einem Phagolysosom, einer primären Vakuole, vor, welches durch die Sekretion des Listeriolysins, eines SH-aktivierbaren hämolytischen Zytolysins (Hly) (Geoffrey *et al.*, 1987, Chakraborty *et al.*, 1987), und der Phosphatidyl-spezifischen Phospholipase A (PlcA) (Camilli *et al.*, 1993) zerstört wird. Die Listerien liegen dann frei im Zytoplasma vor und vermehren sich. Zur Bewegung im Zytoplasma nutzen sie Komponenten des Wirtszellzytoskelett. Hierfür sekretieren die Bakterien den Aktin-Nukleationsfaktor ActA (Domann *et al.*, 1992, Kocks *et al.*, 1992, Cameron *et al.*, 1999), der in der Bakterienmembran verankert bleibt. ActA rekrutiert Aktinfilamente der Wirtszelle an die Oberfläche der Listerien. Das Einwirken

weiterer zellulärer Proteine, wie der Arp2/3-Komplex, α -Actinin, der ENA/VASP-Proteinfamilie und Profilin, führt zu einer Aktinpolymerisation. Es bilden sich Aktinschweife an einem Pol der Bakterienzellen, die diese durch das Zytoplasma schieben (Mogilner *et al.*, 1996, Ireton & Cossart 1997). Stoßen die Listerien an die Plasmamembran der Wirtszelle, entstehen Ausstülpungen, so genannte „protrusions“. Diese werden von der Nachbarzelle phagozytiert und die Bakterien sind nun von einer Doppelmembran eingeschlossen. Durch Sekretion der Phosphatidylcholin (Lezithin)-spezifischen Phospholipase C (PlcB) und Listeriolysin (Hly) befreien sich die Listerien aus dieser sekundären Vakuole (Vazquez-Boland *et al.*, 1992). Die Funktion der Metalloprotease (Mpl) im Infektionszyklus ist neben einer Aktivierung der PlcB weitgehend unbekannt. Deletion. Anschließend liegen die Listerien erneut frei im Zytoplasma der Wirtszelle vor und können ihren Infektionszyklus fortsetzen.

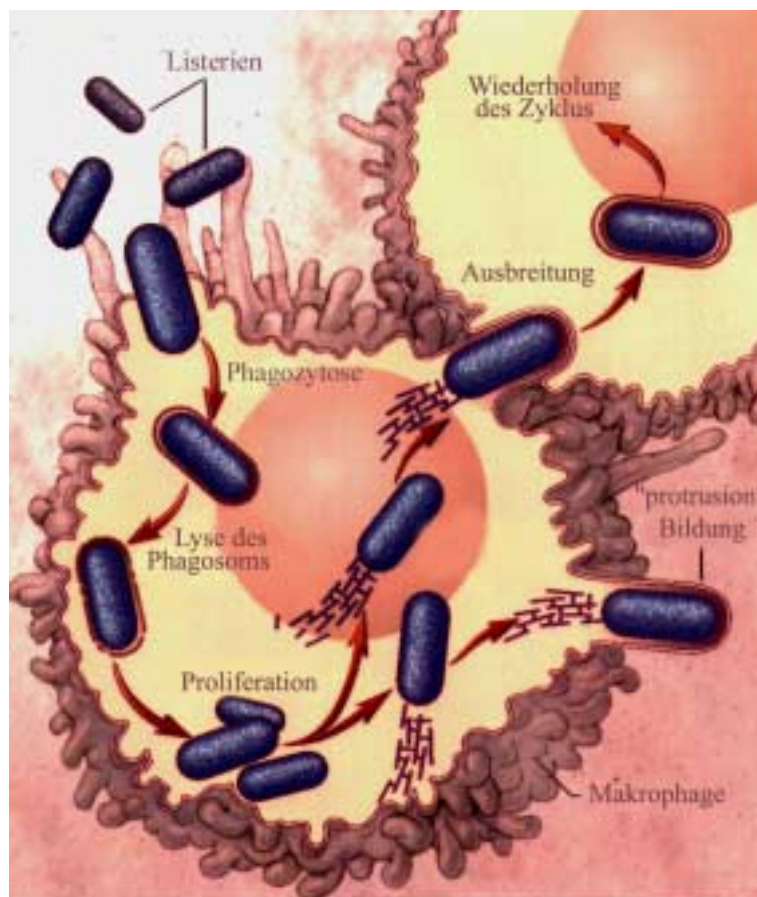


Abbildung 1.2:
Infektionszyklus von
L. monocytogenes

1.1.2 Oberflächenproteine

Da die grundlegenden Schritte der Infektion einer Wirtszelle durch *L. monocytogenes* die Adhäsion und Invasion darstellen, haben die Oberflächenproteine eine besondere Bedeutung. Wichtig für die Invasion sind vor allem die Internaline, Zellwand-assoziierten Polypeptide, welche eine Superfamilie mit bestimmten Charakteristika in ihrem Aminosäureaufbau bilden. Dazu gehören eine N-terminale Signalsequenz, eine Leucin-reiche Wiederholungssequenz (LRR), eine interne Wiederholungsdomäne B und in den meisten Fällen auch ein C-terminaler Zellwandanker. Zur Invasion von Epithelzellen wie Caco-2 Zellen ist das Internalin A (InlA) essentiell. Es bindet an das zelluläre Oberflächenmolekül E-Cadherin (Mengaud *et al.*, 1996) und leitet so die Phagozytose ein. Es besitzt einen typischer Zellwandanker aus 20 zumeist hydrophoben Aminosäuren, einem positiv geladenen Teil und dem sogenannten LPXTG Motiv am C-Terminus (Gaillard *et al.*, 1991). Für den Eintritt in Hepatozyten und einige Epithelzellen wird das Internalin B (InlB) benötigt (Dramsi *et al.*, 1995). Der InlB-abhängige Invasionsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt und scheint komplexer als der InlA-Weg zu sein. Bekannt ist eine Bindung des InlBs an den Wirtszellrezeptor MetR, wodurch die Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase aktiviert wird, die essentiell für der Eintritt in Zellkulturen ist (Shen *et al.*, 2000, Ireton *et al.*, 1996). Den zweiten wichtigen zellulären Bindungspartner stellt das Säugerprotein gC1q/p32 dar, ein Rezeptor des globulären Komplementbestandteils C1q (Braun *et al.*, 2000). Des weiteren bindet Glucosaminyglycan an InlB und kann die Invasion fördern (Jonquieres *et al.*, 2001). Internalin B, ein 65 kD Protein, besitzt eine zusätzliche dritte Wiederholungssequenz, aber keinen charakteristischen Zellwandanker (Braun *et al.*, 1997). Es ist nicht-kovalent durch ein GW-Motiv mit der Zellwand verbunden. Die für Internalin A und B kodierenden Genloci liegen im Listeriengenom nebeneinander und sind in einem Operon organisiert (Lingnau *et al.*, 1995). Davor befindet sich eine PrfA-Bindestelle und zwei weitere Promotoren, die SigB-Bindestellen ähneln. Die Expression von InlA und InlB wird durch PrfA aber auch weitere PrfA-unabhängige Faktoren reguliert (Lingnau *et al.*, 1995). Das Internalin C (InlC oder IrpA) wird sekretiert und findet sich in großen Mengen im Kulturmedium. Es unterliegt ebenfalls einer Regulierung durch PrfA und spielt bei der Invasion eine Rolle (Domann *et al.*, 1997, Engelbrecht *et al.*, 1996). Weitere Vertreter der Internalin-Familie, wie Internalin C2, D, E, F, G und H wurden bereits teilweise charakterisiert (Dramsi *et al.*, 1997, Raffelsbauer *et al.*, 1998, Schubert *et al.*, 2001). Anhand der Genomsequenz von *L. monocytogenes* lassen sich insgesamt 19 LRR/Internalin-Proteine vorhersagen (Glaser *et al.*, 2001).

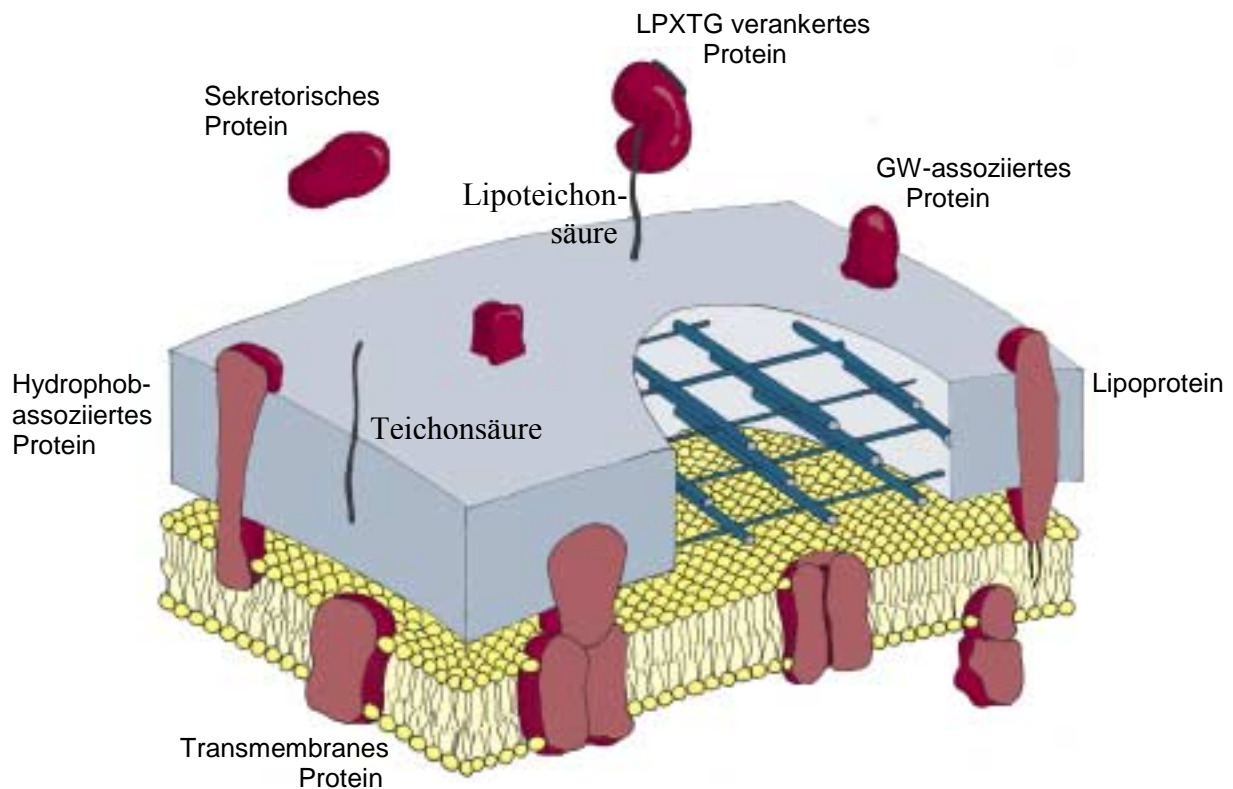


Abbildung 1.3: Modell der Zellwand und Zytoplasmamembran mit den verschiedenen Oberflächenproteinen bei Gram-positiven Bakterien.

Neben den Internalinen gibt es noch eine Vielzahl weiterer Oberflächenproteine, die auf verschiedene Weise mit der Zellwand verbunden oder assoziiert sind (Abbildung 1.3). Eine Möglichkeit ist eine kovalente Bindung an das Peptidoglycan über ein C-terminales LPXTG Motiv. Diese Aminosäuresequenz wird durch die Sortase bei *Listerien* erkannt, das Glycin (G) abgespalten und das Protein über das Threonin (T) verankert (Dhar *et al.*, 2000). Der davor liegende Bereich besteht aus positiv geladenen Aminosäuren, der transmembranen Region, und 20 zumeist hydrophoben Aminosäuren. In der Genomsequenz von *L. monocytogenes* finden sich 41 Gene, die für ein LPXTG Motiv kodieren, mehr als bei allen anderen sequenzierten Bakterien. Eine nicht-kovalente Interaktion von Oberflächenproteinen mit der Zellwand erfolgt durch C-terminale GW-Module, eine Wiederholung der Aminosäuren Glycin und Tryptophan, die mit den Lipoteichonsäuren der Zellwand interagieren. InlB und sieben weitere Gene kodieren für solch eine Sequenz bei *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001). Als nicht-kovalente Bindungspartner erweisen sich auch

hydrophobe C-Termini in 11 Fällen wie z.B. ActA. Außerdem binden noch so genannte P60-ähnliche Proteine mit LysM-Domänen nicht-kovalent an die Listerienzellwand. LysM-Domänen findet man häufig bei Enzymen, die in den Abbau der Zellwand involviert sind (Joris *et al.*, 1992). Sie besitzen des weiteren SH3-Domänen, die mit Wirtszellmolekülen interagieren (Whisstock *et al.*, 1999) und eine NLPC/P60 Domäne mit weitgehend unbekannter Funktion (Kohler *et al.*, 1990). Lipoproteine sind durch den N-Terminus über Fettsäuren mit der Membran assoziiert. Ihre Sequenz enthält nach der Signalsequenz ein Cystein, welches mit einer Glycerid-Thioestergruppe modifiziert wird. Lgt, eine Transferase, überträgt den Diacylglycerylrest der Fettsäure auf die Sulfhydrylgruppe des Cysteins. Die Signalpeptidase II erkennt diese modifizierte Signalsequenz des Prolipoproteins leitet durch Abspaltung des Signalpeptids den Transport aus der Zelle ein. *L. monocytogenes* enthält 68 putative Lipoproteine in seiner Genomsequenz, überproportional viele im Vergleich zu anderen Gram-positiven Bakterien. Dies weist auf wichtige Funktionen der Lipoproteinen und auch weiterer Oberflächenproteine im Infektionszyklus der intrazellulären Listerien hin. Ein Ansatz diese Oberflächenproteine zu identifizieren und ihre Funktionen zu analysieren bietet die Proteomforschung.

1.2 Proteomanalyse

Weltweit wurden bereits zahlreiche Genome sequenziert. Einen Überblick über die Sequenzierungsprojekte und deren aktuellen Stand bieten die Internetseiten www.tigr.org und www.ncbi.gov. Als erster freilebender Organismus wurde das Genom des Bakteriums *Haemophilus influenzae* 1995 sequenziert (Fleischmann *et al.*, 1995), 1996 folgte die Fertigstellung des Sequenzierungsprojekt des ersten Eukaryonten, *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996) und im Zuge des technischen Fortschritts und der Automatisierung wurde 2002 sogar ein Entwurf des menschlichen Genoms veröffentlicht (Lander *et al.*, 2001, Venter *et al.*, 2001). Die DNA-Sequenz eines Organismus bildet die Basis für verschiedene Ansätze der funktionellen Genomforschung, die in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt sind. Liegt die komplette DNA-Sequenz eines Organismus vor, wird diese in der Genomforschung mit bioinformatischen Methoden analysiert und die kodierenden Bereiche bzw. Gene bestimmt. Mit Hilfe von Homologien zu anderen bereits bekannten Genen und allgemeinen genetischen Grundlagen können sogenannte Chromosomenkarten hergestellt werden.

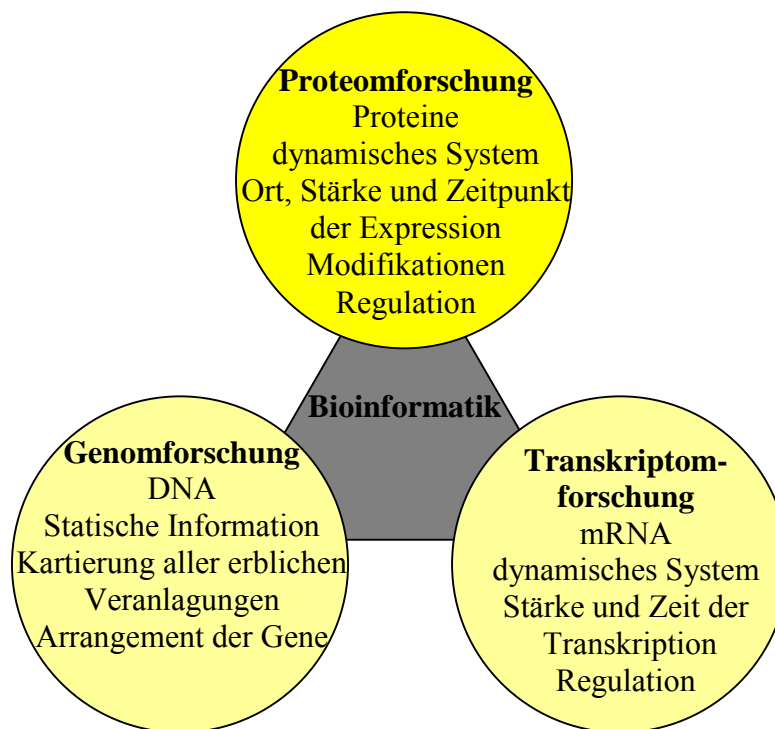


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Bausteine der funktionellen Genomforschung.

Durch Vergleiche findet man hochkonservierte Sequenzen, die in allen Spezies vorkommen und artspezifische Gene. Welche Erbinformation einen pathogenen von einem apathogenen Stamm unterscheidet, ergibt wichtige Hinweise auf Pathogenitätsfaktoren und die Infektionsprozesse. Allerdings gibt die Genomanalyse allein einen eher statischen Überblick auf die Veranlagung und Möglichkeiten eines Organismus und kann die dynamischen Prozesse eines Lebewesens nicht widerspiegeln. Lediglich über Homologien lassen sich Vermutungen über eine Regulation und Funktion der Gene treffen, die nicht immer zutreffend sein müssen. Um diese Vermutungen zu bestätigen und mehr über Funktionen und die vielfältigen Interaktionen zu erfahren, muss man die Genprodukte, die mRNA und Proteine, untersuchen. Mittlerweile ist auch die Hypothese, dass ein Gen für ein Protein kodiert, welches dann eine Funktion ausübt, überholt und nur die Einbeziehung von Splicing, Expression, posttranslationalen Modifikationen etc. geben Aufschluss über ein komplexes regulatorisches Netzwerk in der Zelle. Hierfür haben in der funktionellen Genomanalyse die Bereiche der Transkriptom- und Proteomforschung immer mehr an Bedeutung gewonnen. Für alle Bestandteile der funktionellen Genomforschung ist die Bioinformatik essentiell (Abbildung 1.4). Die Bewältigung der großen Datenmengen ist nur durch die Entwicklung

neuer Computerprogramme und –technologien möglich geworden. Die Transkriptomforschung ermöglicht einen Blick auf die mRNA-Ebene der Zelle. Anhand der mRNA-Menge kann man die Transkriptionsrate eines Gens bestimmen und wertvolle Informationen über die Transkriptionsregulation gewinnen. Die Anzahl der mRNA-Moleküle korreliert jedoch nicht immer mit der Menge des dazugehörigen Proteins (Gygi *et al.*, 1999). Die Expressionsstärke eines Gens kann nur mit Hilfe der Proteomforschung bestimmt werden. Die Proteomforschung umfaßt eine Analyse auf Proteinebene. Dabei wird außerdem Auskunft über den Expressionsort und –zeitpunkt geliefert, was durch Genom- oder Transkriptionsanalysen nicht möglich sind oder nur vermutet werden kann. Es können Aussagen über die Stabilität bzw. Degradationsprozesse und Modifikationen eines Genprodukts erfolgen. Beispielsweise wird ein Gen der Maus durchschnittlich durch drei verschiedene Proteinformen vertreten (Gauss *et al.*, 1999), deren Unterschiede und Bedeutung mit Hilfe der Proteomforschung geklärt werden können. Ausschließlich der Blick auf die Proteine ergibt nachweisliche Informationen über die Funktion und Interaktionspartner dieser Moleküle. Zusammen mit den Hinweisen aus der Genom- und Transkriptomanalyse lassen sich regulatorische Einheiten bestimmen.

Den Begriff „Proteom“ prägten 1995 Wasinger und Kollegen als Kombination der Worte Protein und Genom. Definiert wird das Proteom als Proteinmuster eines Organismus, einer Zelle oder einer Organelle in einem bestimmten Moment unter streng definierten Bedingungen (Lottspeich, 1999). Ein wichtiger Faktor ist die Reproduzierbarkeit der Konditionen, da sich eine Zelle permanent im Auf- und Abbau und einer Reaktion auf ihre Umwelt befindet.

Die grundlegende Methode in der Proteomforschung bildet die zweidimensionale Gelelektrophorese, die eine isoelektrische Fokussierung mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kombiniert (O’Farrell, 1975). Damit können die komplexen Proteingemische aufgetrennt und anschließend durch geeignete Methoden visualisiert und quantifiziert werden. Alternativ werden zur Proteintrennung auch die Flüssigkeitschromatographie oder andere Elektrophoresemethoden eingesetzt. Die limitierenden Faktoren und der Grund für den geringen Einsatz der 2D-Technik in früheren Jahren stellte die schlechte Reproduzierbarkeit der pH-Gradienten und die geringen Proteinmengen einzelner Proteinspots, die eine Identifikation selten ermöglichte, dar. Die Entwicklung der immobilisierten pH-Gradienten (Bjellqvist *et al.*, 1982, Righetti, 1990) und deren kommerzielle Herstellung (Amersham, BioRad, Sigma) erhöhen bzw. ermöglichen die Reproduzierbarkeit auch zwischen verschiedenen Laboren (Blomberg *et al.*, 1995). Die Fortschritte in der Aminosäuresequenzierung (Aebersold *et al.*, 1986, Lopez *et al.*, 1994) und Massenspektrometrie machen heute Identifizierungen von pikomol-Mengen an Protein möglich.

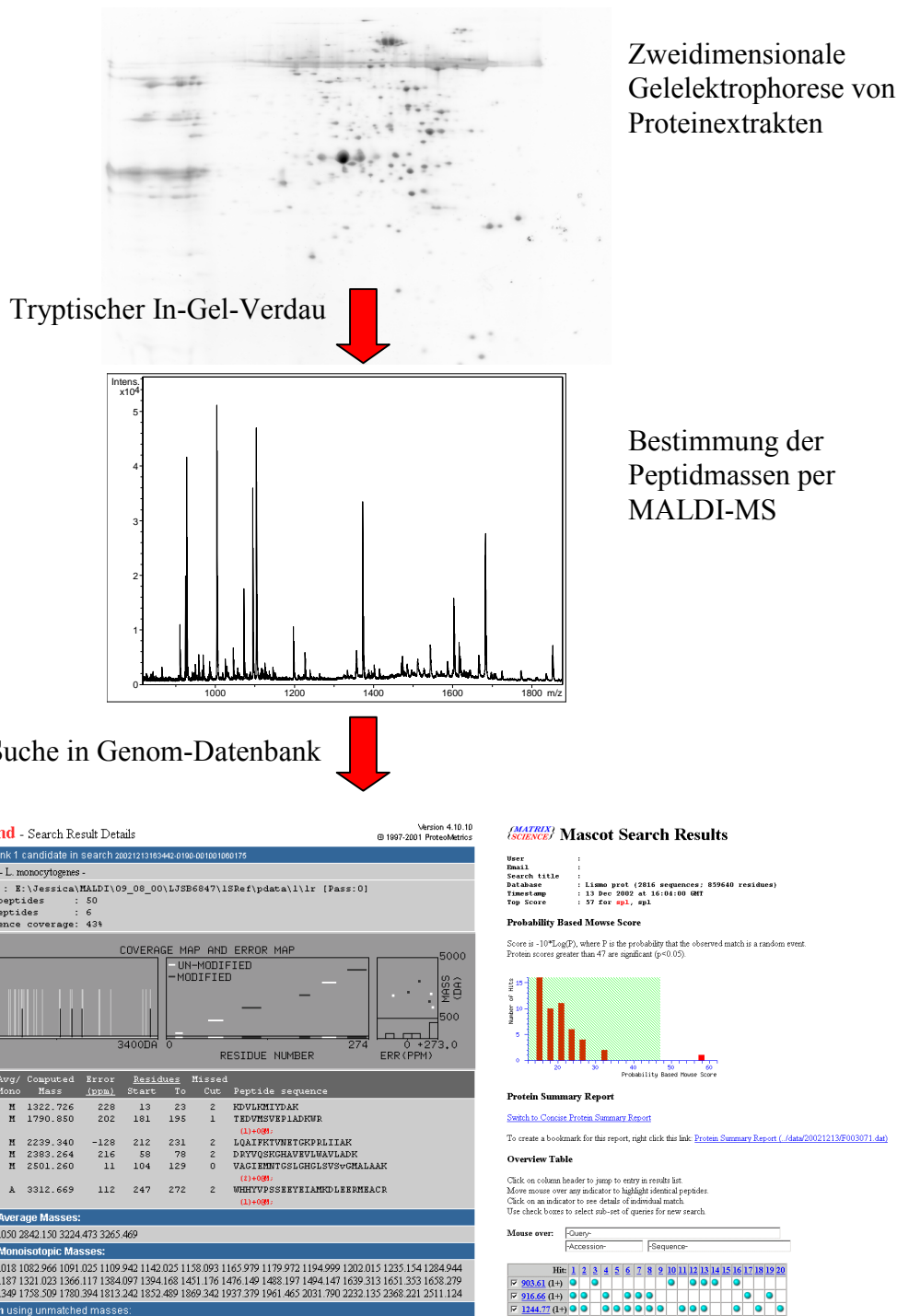


Abbildung 1.5: Peptidmassenfingeraabdruck

In der Proteomforschung benutzt man als schnelle Identifikationsmethode der zweidimensional aufgetrennten Proteine den Peptidmassenfingerprint (Abbildung 1.5). Dabei werden die Proteine durch eine spezifische Protease fragmentiert und die Peptidmasse anhand ihrer Flugzeit (time-of-flight, TOF) bestimmt. Diese Analyse erfolgt mit Hilfe des MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry) oder des Elektrospray-Verfahrens (ESI-Q-TOF), wobei die Peptide ionisiert und im Vakuum beschleunigt werden. Man erhält ein charakteristisches Peptidfragmentmuster, nach dem in einer virtuell translatierten und prozessierten DNA-Sequenz gesucht wird. Für eine zuverlässige Identifikation und eine sinnvolle Zuordnung des jeweiligen Gens ist das Vorhandensein einer vollständigen Genom-Datenbank des Organismus erforderlich. Des Weiteren sind die Suchalgorithmen und Software-Programme entscheidend für den Erfolg der Proteinidentifikation in einer großen Datenmasse. Durch den Fortschritt der Bioinformatik stehen einige effiziente Programme wie ProFound, MASCOT, MS-Prospector, im Internet oder als Softwarepaket zur Verfügung. Diese Programme sind mit beschränkter Funktion jedermann im Internet zugänglich (www.proteometrics.com, www.matrixscience.com, www.expasy.ch) oder werden als interne Datenbanken lizenziert genutzt. Durch Fragmentierung ausgewählter Peptide kann zusätzlich eine Mikroaminosäuresequenz bestimmt werden, die die Signifikanz der Identifikation erheblich verbessert. Ebenso wie bei der Genomanalyse dient die Proteomanalyse zur Charakterisierung der Gesamtheit der Gene bzw. Genprodukte. Aber auch Proteomvergleiche werden durchgeführt, d.h. es werden z.B. 2D-Gele von kranken und gesundem Gewebe, von verschiedenen Wachstumsphasen oder Nährstoffsituationen, von pathogenen und apathogenen Bakterienstämmen im Zusammenhang untersucht. Expressionsunterschiede werden mit Hilfe bioinformatischer Methoden quantifiziert. Durch Computerprogramme wie Phoretix, Melanie, PDQuest, Proteomweaver oder Delta2D wird das Vorhandensein und die Intensität der Färbung eines Proteinspots in einem 2D-Gel ermittelt und die sich hieraus ergebenden Volumenwerte verglichen. Ein wichtiger Faktor ist die Reproduzierbarkeit der Proteinmuster als Momentaufnahme einer Zelle, da eine große Anzahl von Faktoren das Expressionsverhalten bestimmen und somit die äußeren Bedingungen immer gleich gehalten werden müssen. Aussagen über die Expressionsstärke eines Gens kann man auch auf dem Wege der Transkriptionsforschung erhalten. Allerdings korrelieren die mRNA-Mengen mit den Proteinmengen nicht zwingend, da mRNA und Proteine verschiedenen Modifikations- und Degradationsprozessen unterliegen (Gygi *et al.*, 1999). Für eine funktionelle Genomanalyse ist es daher notwendig, alle Gebiete, d.h. Genom-, Transkriptom- und Proteomanalysen zu

kombinieren, um neue Stimulons, Regulons und Operons zu finden und einen Einblick in die multidimensionale Prozesse der Biologie einer Zelle oder eines Organismus zu bekommen.

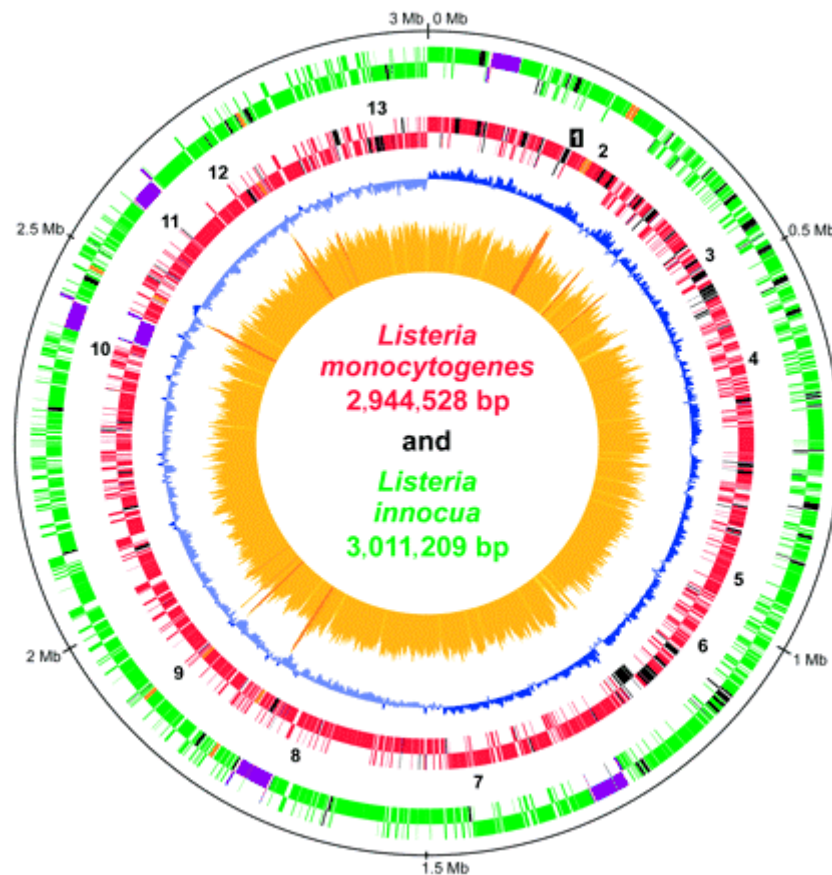


Abbildung 1.6: Zirkuläre Genomkarte von *L. monocytogenes* EGDe und *L. innocua* CLIP11262 (Glaser *et al.*, 2001). Grün sind Gene von *L. innocua* gezeigt, in rot Gene von *L. monocytogenes*, schwarz kennzeichnet Gene, die für einen Stamm spezifisch sind, orange RNA-Operons, purpur Prophagen.

Das Genom von *Listeria monocytogenes* EGDe war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht verfügbar. Im Laufe der Arbeit schritt auch die Sequenzierung des Genoms weiter voran und es standen einige Sequenzabschnitte vor Fertigstellung durch die Kooperation mit dem Pasteur-Institut in Paris zur Verfügung. Diese vorläufigen Sequenzdaten unterlagen allerdings regelmäßigen Änderungen, wiesen Lücken auf und erschwerten somit die Proteomanalysen. Eine vollständige Veröffentlichung mit zuverlässiger Annotation erfolgte erst im Oktober 2001 von Glaser und Kollegen und bildete eine wertvolle Grundlage für die Analysen in der vorliegenden Arbeit. Die Genomsequenz von *L. monocytogenes* ist im Internet unter www.genolist.pasteur.fr/lisilist verfügbar. *L. monocytogenes* besitzt ein zirkuläres

Chromosom aus 2.944.528 Basenpaare, auf dem 2853 proteinkodierende Gene identifiziert werden konnten. 270 dieser Gene besitzen keine Homologie zu einer anderen Spezies und sind daher spezifisch für *L. monocytogenes*. Hervorzuheben sind vor allem die hohe Anzahl der putativen Oberflächeproteine. *L. monocytogenes* enthält mehr LPXTG-Proteine als jedes andere sequenzierte Gram-positive Bakterium. Außerdem wird die Anzahl der Transkriptionsregulatoren nur von *Pseudomonas aeruginosa* übertroffen, wobei ungewöhnlich wenig Sigmafaktoren und ungewöhnlich viele Regulatoren der Crp/Fnr-Familie darunter sind. Viele dieser Regulatoren sind mit den ebenso auffallend zahlreichen PTS (Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase System)-Permeasen assoziiert.

Ebenfalls sequenziert wurde das Genom des apathogenen Stamms *L. innocua*. Die Unterschiede beim Vergleich der Genomsequenzen geben Hinweise auf putative Pathogenitätsfaktoren. (Abbildung 1.6). Zum Beispiel fehlen *L. innocua* einige Vertreter der Internalinfamilie, sowie mehrere sekretorische Proteine, darunter die Gene des bekannten Virulenzgenclusters.

Die postgenomischen Analysen von *L. monocytogenes* haben gerade erst begonnen und die veröffentlichten Ergebnisse aus Transkriptom- und Proteomuntersuchungen beschränken sich hauptsächlich auf die Stressantwort von Listerien. Auf RNA-Ebene gab es eine Untersuchung der Genexpression nach einem Kälteschock von Liu und Kollegen (2002), bei der 24 induzierten Gene gefunden wurden. Phan-Thanh & Gormon veröffentlichten einen Vergleich von 2D-Gelen nach Hitze- sowie Kälteschock, pH-Veränderungen, Zugabe von Detergenzien und Ethanol während der Anzucht. Auffällig war bei diesen Versuchen die vermehrte Expression unter Temperaturstress eines 18 kDa Proteins bei einem isoelektrischen Punkt von 5.1 (Phan-Thanh & Gormon, 1995 und 1997). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Hebraud & Guzzo (2000), die das genannte Protein als Ferritin-ähnliches Protein (Flp) identifizierten. Duche *et al.* (2002) trennten bis zu 500 sichtbare Proteine zweidimensional auf und fanden bei erhöhter Salzkonzentration für 40 Proteinspots ein differentielles Expressionsmuster, zu denen allgemeine Stressproteine, Transporter und Stoffwechselenzyme gehörten.

Eine allgemeine Kartierung von exprimierten Proteinen mit 2D-Gelen bei *Listeria monocytogenes* existiert noch nicht. Somit fehlt vielfach der Nachweis eines Genprodukts von einem kodierenden Bereich im Genom, welcher grundlegend für die weitere Analysen und die Aufklärung der biologischen Prozesse ist.

1.3 Zielsetzung der Arbeit:

Grundlegendes Ziel der Doktorarbeit war es, Oberflächenproteine des Gram-positiven fakultativ intrazellulären Erregers *L. monocytogenes* zu identifizieren und zu charakterisieren. Dabei wurden besonders Zellwand-assoziierte Polypeptide gesucht, die eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Invasion im Infektionszyklus spielen könnten. Die Anreicherung dieser möglichen Virulenzfaktoren erforderte die Entwicklung neuer Extraktionsmethoden zur Gewinnung definierter Subproteome. Die Untersuchung dieser Extrakte sollte mittels der grundlegenden Proteomtechniken, der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie, durchgeführt werden. Ziel war eine Kartierung und Charakterisierung des Subproteoms der Zellwand und die funktionelle Analyse einzelner bisher unbekannter Proteine durch biochemische und infektionsbiologische Untersuchungen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Allgemeines Material und Chemikalien

Alle Chemikalien und Materialien wurden soweit nicht anders erwähnt von den Firmen Merck, Fluka, Boehringer oder Sigma verwendet.

2.2. Allgemeine Puffer

PBS (phosphate buffered saline)

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,77 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,24 g KH_2PO_4

ad 1 L mit bidest. Wasser

TBS (Tris buffered saline)

6 g Tris base

11,7 g NaCl

ad 1 L mit bidest. Wasser pH 7.5

2.3. Kultivierung von Bakterien

2.3.1. Verwendete Bakterienstämme

Verwendet wurde der *Listeria monocytogenes* EGDe Wildtyp Stamm (WT), eine Deletionsmutante Δ *prfA*, ein isogener konstitutiv PrfA überexprimierender Stamm pERL 7973 (*prfA*⁺), sowie eine Deletionsmutante Δ *lmo1847*. Die Anzucht erfolgte in BHI- oder Minimal-Medium.

Außerdem wurden zur Klonierung *Escherichia coli* TG2 und BL21, sowie TOPO One shot® chemically competent *E. coli* (Invitrogen) eingesetzt, die in LB-Medium angezogen wurden.

Stammkulturen wurden aus 750 µl einer Übernachtskultur mit 250 µl Glycerin hergestellt und bei -80 °C gelagert.

2.3.2. Kulturmedien und Antibiotika

BHI-Medium:

37 g Brain-Heart-Infusion wurden in einem Liter Wasser gelöst, filtriert (10 kD Ausschlußvolumen) und autoklaviert.

BHI-Agarplatten:

16 g Bacto-Agar wurden in einem Liter BHI-Medium gelöst.

LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und 120 mM NaCl wurden in einem Liter Wasser gelöst und autoklaviert.

LB-Agarplatten:

16 g Bacto-Agar wurden in einem Liter LB-Medium gelöst.

SOC-Medium:

20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 0,6 g NaCl und 0,19 g KCl wurden in einem Liter Wasser gelöst und autoklaviert. Eine Glucose Stammlösung (2M) und eine Mg-Salz-Stammlösung (20,3 g/100 ml $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24,7 g/100 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) wurden hergestellt, sterilfiltriert und in 1:100 zu dem Medium pipettiert.

Minimal-Medium:	g/L	Stammlösung
KH_2PO_4	6,56	} 10 x
$\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30,96	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,41	100 x
Eisencitrat	0,088	50 x
Glucose	10	20 x
L-Cystein HCl	0,1	50 x
L-Glutamin	0,6	50 x

L-Leucin	0,1	}	100 x
DL-Isoleucin	0,1		
DL-Valin	0,1		
DL-Methionin	0,1		
L-Arginin HCl	0,1		
Biotin	0,5 mg		20.000 x
Riboflavin	5 mg		2.000 x
Thiamin HCl	1 mg		10.000 x
Thioctinsäure	5 µg		20.000 x

Das Medium muß immer frisch angesetzt werden, da einige Bestandteile gemeinsam ausfallen. Mehrere Bestandteile wurden zuvor gemeinsam in Stammlösungen angesetzt, autoklaviert oder sterilfiltriert.

Antibiotikazusätze:

100 mg/ml Ampicillin wurden in bidest. Wasser und 5 mg/ml Erythromycin in 70 % Ethanol gelöst, anschließend sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Diese Stammlösungen wurden 1:1000 eingesetzt.

2.4. Kultur von Gewebezellen

2.4.1. Medien und Zusätze

DMEM

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium mit 1000 mg/ml Glukose und 110 mg/ml Na-Pyruvat (Gibco BRL)

MEM

Minimal Essentielles Medium mit 1,5 g/L Natriumbicarbonat (Gibco BRL)

FCS

Fötale Kälber Serum wurde bei 56 °C eine Stunde hitzeinaktiviert und sterilfiltriert (Gibco BRL)

L-Glutamin

0.2 M L-Glutamin (Flow Laboratories)

Trypsin/EDTA-Lösung

0,5 g/L Trypsin-EDTA, 0,2 g/L EDTA (Gibco BRL)

2.4.2. Zellen und Kulturbedingungen**Vero**

Die Nierenepithelzellen aus dem Affen (ATCC CCL-81) wurden in MEM mit Zusatz von 7.5 % FCS und 2 mM L-Glutamin bei 37 °C und 7.5 % CO₂ kultiviert.

HeLa

Die humanen Epithelzellen eines Adenokarzinoms (ATCC CCL-2) wurden in DMEM mit Zusatz von 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin bei 37 °C und 8 % CO₂ kultiviert.

PtK2

Die Nierenepithelzellen aus der Beutelratten (ATCC CCL-56) wurden in MEM mit Zusatz von 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin bei 37 °C und 7.5 % CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden in 10 cm Petrischalen (Nunc) oder auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Zur Passage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 3-5 min. mit einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sie sich abspülen ließen. Es erfolgte ein Mischen mit neuem FCS-haltigen Medium und Rekultivierung in neuen Kulturgefäßen. Für die Lagerung der Zellen wurden die Zellen bis 90 % Konfluenz angezogen, abtrypsiniert und bei 1.000 x g für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden langsam auf –80 °C heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Aliquots im 37 °C warmen Wasserbad schnell erwärmt und zu frischem Medium in Kulturgefäßen gegeben.

2.5. Infektion von Gewebekulturzellen mit *Listeria monocytogenes*

Zwei Tage vor der Infektion wurden 5×10^4 eukaryontische Zellen pro Milliliter ausgesät und weiter im Brutschrank inkubiert. Am Abend vor der Infektion wurden 5 ml BHI mit Listerien angeimpft und über Nacht bei 37° C und 180 rpm geschüttelt. Zur Infektion wurde 1 ml Listerienkultur 3 min bei 3.000 x g pelletiert und dreimal mit PBS gewaschen, um Kulturmediumreste zu entfernen. Die Bakterien wurden anschließend in Infektionsmedium (Zellkulturmedium ohne FCS) resuspendiert und darin 1: 1000 verdünnt. Die zu infizierenden eukaryontischen Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, um infektionshemmendes FCS zu entfernen. Auf die Zellen wurden die mit Infektionsmedium verdünnten Listerien pipettiert und 3 min bei 1000 x g und 37 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen weiter bei 37 °C und 7.5 % CO₂ inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das Infektionsmedium durch Gentamycin-haltiges (50 µg/ml) Kulturmedium ersetzt wurde. Ein dreimaliger Waschschrift mit PBS dazwischen sollte die Entfernung überschüssiger, extrazellulärer Listerien unterstützen.

2.5.1. Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden spezielle Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) an Proteine oder andere Zellbestandteile gekoppelt. Durch Anregung dieser Farbstoffe mit einer definierten Wellenlänge emittieren sie Licht mit einer längeren Wellenlänge, beginnen also zu fluoreszieren. Dadurch ist es möglich, die räumliche und zeitliche Lokalisation der markierten Zellbestandteile in einer lebenden oder fixierten Zelle zu bestimmen.

Das optische System eines Fluoreszenzmikroskops weist im Gegensatz zu einem normalen Mikroskop einige Besonderheiten auf. Es besteht aus zwei Sperrfiltern und einem dichroitischen Spiegel. Eine Quecksilberhochdruckdampflampe strahlt Licht auf den ersten Sperrfilter, dieser ermöglicht nur den Durchtritt von Licht einer bestimmten Wellenlänge, mit der die Fluorochrome angeregt werden sollen. Das Licht trifft auf den dichroitischen Spiegel, welcher das Licht reflektiert und durch das Objektiv auf die Probe leitet. Die Fluorochrome absorbieren das Licht und emittieren energieärmeres, also längerwelliges Licht. Das längerwellige Licht wird von dem dichroitischen Spiegel nicht reflektiert und trifft auf einen

zweiten Sperrfilter, wodurch gestreutes Anregungslicht gefiltert wird und dann in das Okular geleitet wird.

Das emittierte Licht wird zum Okular geleitet oder von einer CCD-Kamera aufgenommen, durch einen A/D-Wandler in digitale Graustufenwerte umgesetzt und kann dann an einem Computer mit geeigneter Bildverarbeitungssoftware bearbeitet werden.

Geräte

Mikroskop:

Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135 TV (Carl Zeiss) mit regelbarer 100 W Quecksilberhochdruckdampflampe (AttoArc System, Carl Zeiss) und manuell oder Software kontrollierbaren Filterrad; durch Optovar-Linsen läßt sich die Gesamtvergrößerung um das 1,6 fache bzw. 2,5 fache erhöhen.

Objektive:

Plan-Apochromat- und Plan-Neofluar-Immersionsölobjektive (Carl Zeiss):

100x 1,3 NA

40x 1,4 NA

Das verwendete Immersionsöl (Carl Zeiss) hat einen Brechungs faktor von 1,518.

Beleuchtung:

Regelung der Beleuchtung durch elektrisch aktivierbare Schnellverschlüsse (UniBlitz Modul D 122 Shutter-Driver, Visitron Systems), Shutter, manuell oder Software-unterstützt.

CCD-Kamera-System :

Auf -25°C gekühlte Charged-Coupled-Device-Kamera (TE/CCD-1000 TKB, Princeton Instruments Inc.) mit elektronisch aktivierter Kontrolleinheit und Verschluß.

Aufnahmekontrolle und Bildverarbeitung :

Die Aufnahmekontrolle, Kontrolle der Schnellverschlüsse, die Kamerasteuerung und Bildverarbeitung erfolgt mit der IPLab Spectrum Scientific Imaging Software an einem Apple Macintosh 9500/200. Die weitere Bildverarbeitung für die Präsentation erfolgt mit Adobe Photoshop 5.0 und Adobe Page Maker an einem Apple Macintosh 9500/350.

2.5.2. Immunfluoreszenzaufnahmen fixierter Zellen

Bei der indirekten Immunfluoreszenz fixierter Zellen erfolgt die Visualisierung der Proteine durch die Bindung eines primären Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einem primären Antikörper wird eine hohe Sensitivität erreicht, deren Prinzip auch in quantitativen Methoden genutzt wird (z.B. ELISA).

Für Immunfluoreszenzaufnahmen von mit Listerien infizierten Zellen wurden die eukaryotischen Zellen jeweils auf 12 mm Deckgläschen in einer 6 cm Petrischale (Nunc) mit 4 ml Kulturmedium ausgesät (5×10^4 Z/ml). Die Infektion wurde wie oben (2.5) beschrieben durchgeführt. Zur Fixierung der infizierten Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen und 20 min mit 2 ml 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur inkubiert, welches eine Vernetzung von Proteinkomponenten verursacht. Die Zellen wurden einmal mit PBS und einmal mit CB-Puffer gewaschen und für 1 min bei Raumtemperatur mit 0,2 % igemTriton X-100 permeabilisiert, damit die Antikörper später an die entsprechenden Zellkomponenten gelangen können. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit CB-Puffer gewaschen. Für die folgende Antikörperhybridisierungen wurden die jeweiligen Lösungen auf ein Stück Parafilm getropft und die Deckgläschen mit der zelltragenden Seite darauf gelegt. Die Deckgläser wurden zum Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen auf 15 µl 1 % BSA-Lösung für 15 min inkubiert. Nach Waschen der Deckgläschen mit TBS erfolgte eine Inkubation mit 15 µl des Antikörpers K52 (s.u.) und Phalloidin für eine Stunde in einer feuchten Kammer. Durch dreimaliges Waschen mit TBS wurden überschüssige Antikörper entfernt. Die Inkubation mit 15 µl des Sekundärantikörpers B12C wurde für 30 min in der feuchten Kammer durchgeführt. Die Deckgläschen wurden dreimal in TBS gewaschen, auf 2 µl Prolong (Molecular Probes) auf einem Objektträger gelegt und 1 Stunde getrocknet.

Verwendete Antikörper:

K52 : Maus anti allg. Listerienproteine IgG

Verdünnung 1:1000 in 10 % FCS in PBS

B12C: Ziege anti Kaninchen IgG an Alexa FluorTM 488 (Molecular Probes) gekoppelt

Verdünnung 1:500 in 10 % FCS in PBS, erscheint im Mikroskop grün.

Phalloidin:

Phalloidine sind Toxine des Knollenblätterpilzes *Amanita*. Sie lagern sich seitlich an die Aktinfilamente an und blockieren dadurch die Depolymerisation. Durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an Phalloidin gekoppelt werden, kann F-Aktin für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

APh12: Phalloidin gekoppelt an Alexa Fluor™ 594 (Molecular Probes), Verdünnung 1:300 in 1% BSA-Lösung in PBS, erscheint im Mikroskop rot.

2.5.3. Gentamycinassay

Mit diesem Versuch wurde die Invasivität und das intrazelluläre Wachstum verschiedener *Listerien*stämme in eukaryontischen Zellen verglichen.

Die eukaryontischen Zellen wurden wie oben beschrieben in 24 well-Kulturplatten (1ml/well) ausgesät und mit *Listeria monocytogenes* WT und *ΔLmo1847* infiziert. Die Inkubation in Gentamycin-haltigem Kulturmedium betrug eine, drei, fünf oder sieben Stunden und sollte die überschüssigen, extrazellulären Bakterien abtöten. Diese wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Um die eukaryontischen Zellen aufzubrechen und die intrazellulären Bakterien freizusetzen, wurden 500 µl eiskaltes 0.2 % iges Triton X-100 für 1 min auf die Zellen gegeben. Die Bakteriensuspension wurde mit der Pipette gut durchmischt und in PBS 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} und 10^{-8} verdünnt. Die einzelnen Verdünnungsstufen aus den verschiedenen Infektionszeiten wurden mit Hilfe des Spiroplaters (Autoplate® 4000, Spiral Biotech) auf BHI-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und somit die Anzahl intrazellulärer *Listerien* bestimmt.

2.6. Herstellung von Oberflächenproteinextrakten**2.6.1. Extrakte von Zellwand-assoziierten Proteinen (serielle Extraktion)**

Listerien wurden in Zwei-Liter-Erlenmeyerkolben mit 300 ml BHI-Medium von Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4.000 x g für 12 min. pelletiert und mit PBS gewaschen. Die Extraktion erfolgte seriell durch verschiedenen Puffer, Salze und Detergenzien. Hierzu wurde das

Zellpellet zuerst in einem Fünfhunderstel des Kulturvolumens resuspendiert und für 30 min. bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer 12 minütigen Zentrifugation bei 4.000 x g konnte der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert werden. Das Pellet wurde jeweils mit PBS gewaschen und mit der nächsten Substanz inkubiert. Die Reihenfolge für die Extraktion war:

1 M Tris/HCl pH 7.5

1 M KSCN

1 % CHAPS

1 % CTAB

1 % Octylglucosid

0.5 % SDS

2.6.2. Endolytische Protoplastierung

Protoplastenpuffer:

1 M Saccharose

30 mM NaCl

50 mM Tris pH 7.5

10 mM MgCl \cdot 6H $_2$ O

Listerien aus Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation mit 4.000 x g bei 4 °C für 12 min. geerntet und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Protoplastenpuffer mit 100 μ l des Endolysins HPL511 (3,3 mg/ml), 0,1 mg Mutanolysin und 10 μ l Benzonase resuspendiert. Der Zellwandverdau erfolgte für 10 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Die intakten Protoplasten wurden bei 1.500 x g 30 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand mit den Zellwandfragmenten wurde erneut zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C aufbewahrt. Die Protoplasten wurden in 5-10 ml bidest. Wasser aufgenommen und mit einer Tablette Mini complete® (Proteaseinhibitoren von Roche) versetzt. Mit Hilfe eines Potters wurden die Protoplasten aufgebrochen und für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Pellet stellte die unlösliche Membranfraktion dar und wurden nach Waschen mit dem Protoplastenpuffer ohne Saccharose bei -20 °C gelagert.

2.6.3. Aminopeptidase-Test (PepC-Test)

Puffer:

20 mM Tris/HCl pH 7.4

Substrat-Lösung:

200 mM L-Arginin-para-nitroanilid in 20 mM Tris pH 7.4

Diese Lösung wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und 1:100 eingesetzt.

Enzym-Lösung:

Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* (Sigma), 100 Units in 200 μl 20 mM Tris pH 7.4

Um zu Überprüfen, dass die Zelloberflächenproteinextrakte auch möglichst nicht mit cytoplasmatischen Proteinen durch aufgeplatzte Zellen verunreinigt waren, wurde der Aminopeptidase-Test mit frisch hergestellten Extrakten durchgeführt. Aminopeptidase ist ein cytoplasmatisches Protein, als PepC im *Listeriengenom* annotiert, und setzt in einer messbaren Farbreaktion Para-Nitroanilide verschiedener Aminosäuren um.

Hierfür wurden 950 μl Puffer mit 10 μl der Substrat-Lösung und 40 μl Extrakt vermischt und in eine 1 ml Küvette bei 405 nm photometrisch (Hitachi, Spectrophotometer U2000) über 5 min gemessen. Zur Kontrolle für die Funktion des Tests wurden anstatt des Extrakts 10 μl reine Aminopeptidase (5 Units) eingesetzt.

2.7. Allgemeine biochemische Methoden

2.7.1. TCA/Aceton-Fällung

Um die Proteinextrakte aufzukonzentrieren und von Salz-und Detergenz-Rückständen zu befreien wurde eine Proteinfällung durchgeführt. Hierzu wurden die Extrakte 1:250 mit Natriumdesoxycholat (50 mg/ml) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1/5 des Volumens einer 30 % igen TCA-Lösung erfolgte eine Inkubation für weitere 60 min auf Eis. Nach einer Zentrifugation bei $16.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in bidest. Wasser resuspendiert. Hierzu wurde das fünffache Volumen an eiskaltem Aceton zugegeben und die Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 1 Stunde

inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 16.000 x g oder 60 min bei 4.000 x g wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in SDS-Probenpuffer (siehe 2.7.3) oder QuellsLösung (siehe 2.8) aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.7.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Extrakte wurden jeweils dreimal 10 µl einer Probe mit 200 µl Bradfordreagenz (Biorad, 1:5 verdünnt) in einer Mikrotiterplatte vermischt, 10 min bei RT inkubiert und bei 595 nm im SpectraMax 250 (Molecular Devices) gemessen. (Bradford 1976). Mit Hilfe einer Standardreihe mit BSA in den definierten Konzentrationen 0,1 mg/ml bis 1 mg/ml wurde der Proteingehalt der Extrakte aus der Absorption errechnet. Hierfür wurde die Software SoftMax™Pro (Molecular Devices) verwendet.

2.7.3. SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurde angewandt, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Zur Durchführung wurde das Protean™ II System von Biorad (160 x 180 x 15 mm) und das Minigel-System von Biometra (65 x 85 x 0,5 cm) genutzt. Die Proben wurden vorher in SDS-Probenpuffer 10 min bei 95 °C erhitzt. Für die Minigele wurde das Einlaufen der Proben in das Sammelgel bei 120 V durchgeführt und die Spannung dann für ca. 1 h auf 160 V erhöht. Die Proteangele liefen bei 70 V und 18 °C über Nacht.

SDS-Probenpuffer (2x)

10 % SDS-Lösung	2 ml
0.5 M Tris/HCl pH6.8	300 µl
Glycerin 87 %	2 ml
2-Mercaptoethanol	200 µl
5 % Bromphenlblau	100 µl
bidest. Wasser	7,4 ml

Trenngel 10 %	2 Minigele	1 Proteangel
bidest. Wasser	6,1 ml	15,8 ml
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	3,8 ml	9,9 ml
Acrylamid (30 %)	5,0 ml	13,2 ml
10 % SDS	150 µl	400 µl
25 % APS	20 µl	30 µl
TEMED	20 µl	30 µl
Sammelgel		
bidest. Wasser	2,9 ml	10,0 ml
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	1,2 ml	1,7 ml
Acrylamid (30 %)	0,9 ml	1,3 ml
10 % SDS	50 µl	130 µl
25 % APS	15 µl	30 µl
TEMED	10 µl	20 µl
SDS-Laufpuffer		
Tris base	5,8 g	
Glycin	29,9 g	
SDS	1,9 g	
ad 2 L mit bidest. Wasser		

2.7.4. Proteinfärbungen

Für die Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden verschiedene Färbemethoden verwendet:

2.7.4.1. Silberfärbung

Um Gele mit einer geringen Gesamtproteinmenge anzufärben, wurde die Silberfärbung angewandt, die sehr sensitiv, aber nicht mit MALDI- und Q-TOF-Analyse kompatibel ist. Die Silberfärbung wurde modifiziert nach Blum (1987) in Polyethylenwannen durchgeführt.

1. Fixieren	40 % Ethanol	
	10% Essigsäure	
	50 % bidest. Wasser	1-3 h
2. Waschen	20 % Ethanol	3 x 30 min
3. Sensitivieren	0,02 % Natriumthiosulfat	1 min
4. Färben	0,2 % Silbernitrat	
	0.02 % Formaldehyd	20 min
5. Waschen	bidest Wasser	3 x 1 min
6. Entwickeln	3 % Natriumcarbonat	
	0,05 % Formaldehyd	
+ 20 ml Sensitivier-Lsg.	3-9 min	
7. Waschen	bidest. Wasser	2 x 1 min
8. Stoppen	0,37 % EDTA	10 min

2.7.4.2. Färbung mit Coomassie brilliant blue

Um Proteine auf PVDF-Membranen anzufärben wurden diese für 10 min in Coomassie-Färbelösung und anschließend 10 min in Entfärber geschwenkt. Die Membran wurde zwischen Filterpapier an der Luft getrocknet.

Färbe-Lösung:

0,1 % (w/v)	Coomassie brilliant blue R-250
25 % (v/v)	Isopropanol
10 % (v/v)	Essigsäure
65 % (v/v)	bidest. Wasser

Entfärber:

40 % Essigsäure
10 % Methanol
50 % bidest. Wasser

2.7.4.3. Kolloidal Coomassie-Färbung (Neuhoff-Färbung)

Proteine in Gelen wurden mit kolloidalem Coomassie oder RuBPS angefärbt, da diese Methoden sensitiver als Coomassie sind und im Gegensatz zur Silberfärbung bei der MALDI- oder Q-TOF-Analyse nicht stören. Die kolloidale Coomassie-Färbung wurde nach Neuhoff (1980) durchgeführt. Die Gele wurden über Nacht in Neuhoff-Färbelösung geschwenkt und dann in Wasser gelegt.

Neuhoff-Lösung A:

10 % (w/v) Ammoniumsulfat

2 % (W/v) Phosphorsäure

Neuhoff-Lösung B:

1 g Coomassie brilliant blue G-250 in bidest. Wasser

Neuhoff-Färbe-Lösung:

800 ml Neuhoff-Lsg A + 2 ml Neuhoff-Lsg B + 200 ml Methanol

Die Lösung wurde filtriert und 1 Stunde kräftig geschüttelt.

2.7.4.4. RuBPS-Färbung

Der fluoreszierende Farbstoff Ruthenium II tris (bathophenanthrolin disulfonat) ist ein Derivat des SyproRuby-Farbstoffes nach Rabilloud et al. (2002). Die Färbung ist ähnlich sensitiv wie die Silberfärbung, aber kompartibel mit MALDI- und Q-TOF. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mindestens 1 Stunde in 40 % Ethanol 10 % Essigsäure fixiert und zweimal 15 Minuten mit 20 % Ethanol gewaschen. Zur Färbung wurden 10 µl der nach Rabilloud et al. hergestellten Stammlösung in einem Liter 20 % igem Ethanol gegeben. Die Gele wurden über Nacht in der Färbelösung inkubiert und hinterher in Fixier-Lösung aufbewahrt oder getrocknet.

2.7.5. Westernblot

Blotpuffer:

192 mM Glycin	14,3 g/L
25 mM Tris base	3,0 g/L
0,1 % SDS	1,0 g/L
20 % Methanol	200 ml/L

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus den Gelen auf eine immobilisierende Trägermatrix zu übertragen, wurden die Gele auf eine PVDF-Membran gelegt, darüber und darunter luftblasenfrei in Blotpuffer getränktes Papier (Towbin, 1979). Die von SDS umgebenen, negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld aus dem Gel auf die Membran zum Pluspol. In einer Semidry-Blotkammer fand der Transfer für 60-90 min bei 1 mA/cm² statt.

2.7.6. Immunfärbung und Chemolumineszenz

Die proteintragende Membran wurde mindestens eine Stunde mit 10% igem FCS abgesättigt und anschließend mit dem ersten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran jeweils 10 min mit TBS-T (TBS mit 0,1 % Tween20), TBS-T 0.5 M NaCl und TBS-T 0.5 % Triton gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Peroxidase gekoppelten Antikörper erfolgte 30 min bei Raumtemperatur. Nach Wiederholung des Waschschritts wurde die Antikörperbindung an ein spezifisches Protein auf der Membran durch die chemische Reaktion der Peroxidase sichtbar gemacht. Hierfür wurden 5 ml der Lumilight Western Blotting Substrate 1 (Amersham) und 5 ml Lumilight Western Blotting Substrate 2 (Amersham) vermischt und die Membran 5 min in der Lösung inkubiert. Mit Hilfe der CCD-Kamera (FujiFilm LAS-1000 mit Ethidiumbromid-Filter von Raytest) in einer Dunkelkammer (Intelligent Dark Box, Fuji) auf einem UV-Leuchtschirm (LAS-1000 von Raytest) wurde die Chemolumineszenz detektiert und verarbeitet. Die Bilder der Kamera wurden mit der Software Image Reader (FujiFilm) aufgenommen und mit AIDA Image Analyzer bearbeitet..

Primärantikörper:

α alp2	Kaninchen anti Alp (<i>L. monocytogenes</i>) IgG, Verdünnung 1:500 in 10 % FCS in PBS
m α GST	Maus anti GST, Zellkulturüberstand
p α P70	Kaninchen anti P70 (<i>L. monocytogenes</i>) IgG, Verdünnung 1:1000 in 10 % FCS in PBS
m α P70	Maus anti P70 (<i>L. monocytogenes</i>) IgG, Zellkulturüberstand

Sekundärantikörper:

A4a	Ziege anti Maus, Peroxidase gekoppelt, Verdünnung 1:2000 in 10 % FCS in PBS, (Dianova)
B4c	Ziege anti Kaninchen, Peroxidase gekoppelt, Verdünnung 1:2000 in 10 % FCS in PBS, (Dianova)

2.7.7. N-terminale Sequenzierung

Zur Identifizierung der Proteine auf PVDF-Membran wurden diese mit Coomassie brilliant blue R-250 angefärbt. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und durch einen Applied Biosystems gas-phase sequenator (model 494) mit online phenylthiohydantoin Aminosäure Analyser die N-terminale Aminosäure-Sequenz bestimmt.

2.7.8. Affinitätschromatographie (FPLC)

Die „Fast Performance Liquid Affinity Chromatography“ (FPLC) ist eine Standardmethode der Affinitätschromatografie, bei der die mobile Phase flüssig ist und die Beladung, Bindung und Elution über Pumpen und die Fließrate gesteuert wird.

10 ml Chelatsepharose (Amersham) wurden in eine Säule gefüllt und mit bidest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit Zink bzw. Mangan beladen, indem 0.1 M ZnSO_4 bzw. 0.1 M MnCl bei einer Fließrate von 1 ml/min über die Chelatsepharose gegeben wurde. Die Säule wurde mit 5 mM Imidazol gewaschen und 10 ml steriltfiltrierter

Zellwandextrakt mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über das Säulenmaterial gepumpt. Der Durchfluß wurde aufgefangen und bei 4 °C aufbewahrt. Die Säule wurde erneut mit 5 mM Imidazol gewaschen, der Durchfluß bei 4 °C aufbewahrt und ein Imidazolgradient aufgebaut. Hierfür wurde die Konzentration innerhalb von 30 Minuten von 5 mM Imidazol auf 250 mM erhöht (1ml/min). Die Elution erfolgte für 30 Minuten bei 30 ml/min mit 250 mM Imidazol. Mit einem Fraktionssammler wurden 15 Fraktionen zu je 2 ml gesammelt.

2.8. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteinextrakte von *L. monocytogenes* wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell (1975) angewandt. Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine in der ersten Dimension wurde die Methode der IEF durch immobilisierte pH-Gradienten (Bjellqvist *et al.*, 1982; Righetti, 1990) gewählt. Die zweite Dimension stellte eine SDS-PAGE dar (Laemmli, 1970), deren Laufrichtung um 90 ° versetzt war.

2.8.1. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Bei der isoelektrischen Fokussierung sammeln sich die Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt (pI) im pH-Gradienten. Da Proteine eine Nettoladung besitzen, wandern sie im elektrischen Feld zum entgegengesetzten Pol. Diese Nettoladung ändert sich mit dem pH-Wert des umgebenden Milieus und ist an einem bestimmten Punkt gleich Null. Das Protein wird an diesem isoelektrischen Punkt fokussiert.

Für die IEF wurde das System der IPGphor (Amersham) mit fertigen IPG-Gelstreifen (Immobiline dry Strips von Amersham) verwendet. Hierbei erfolgte schon während der Rehydratisierung ein Einquellen der Proteinprobe in die Gele (Rabilloud *et al.*, 1994).

Quell-Lösung:

Eine 9 m Harnstoff-Lösung wurde hergestellt, mit einer Spatelspitze Ionenaustauscher Serdolit MB-1 (Serva) versetzt und nach 10 min über einen Faltenfilter gegeben. 200 mg CHAPS, 2 mg Tris base, 46 mg DTT und eine Tablette Complete™ Mini (Proteaseinhibitoren von Roche) wurden eingewogen und mit der filtrierten Harnstoff-Lösung auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt.

Die ceramidischen IPG Strip Holder von Amersham wurden über Nacht zur Reinigung in RBS 35 (Roth), ein stark alkalisches Reinigungsmittel, inkubiert. Später wurden sie mit deionisierten Wasser sorgfältig gespült, getrocknet und mit Repel-Silane ausgewischt. Die Strip Holder wurden dadurch hydrophob und die Poren des ceramiden Materials verschlossen. Die Holder wurden noch einmal kurz abgespült und getrocknet. Das Ansetzen der zu fokussierenden Proben fand in 1,5 ml Reaktionsgefäßen statt. Dabei wurde die gewünschte Menge des Extraktes, je nach Proteinkonzentration, in Bromphenolblau gefärbte Quell-Lösung mit Zusatz von 0,5 % IPG Buffer pipettiert. Das Endvolumen einer Probe hing von der Länge des immobilisierten IPG-Streifens ab. Die 11 cm Streifen benötigen 200 µl Quell-Lösung inkl. Probe, 18 cm Streifen dagegen 380 µl. In den IPG Strip Holdern wurde über die Elektroden jeweils ein kleines Filterpapierblättchen (Sample applicationen pieces von Amersham) gelegt und mit 20 µl Quell-Lösung getränkt. Anschließend wurde die Probe gleichmäßig in dem jeweiligen Strip Holder verteilt und ein IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten aufgelegt. Eine Übersichtung mit Silikonöl und das Auflegen eines Deckels schützte vor Verdunstung und Austrocknung.

Als IPGphor-Programm für die isoelektrische Fokussierung wurde folgendes verwendet bis zu einer Dauer von 50.000-80.000 Voltstunden mit der Limitierung bei 40 µA pro Gelstreifen:

Rehydration	0 V	4 h	Step-n-hold
Step 1	30 V	10 h	Step-n-hold
Step 2	100 V	1 h	Gradient
Step 3	1000 V	1 h	Gradient
Step 4	8000 V	3 h	Gradient
Step 5	8000 V	∞	Step-n-hold

2.8.2. Äquilibrierung

Um die isoelektrisch aufgetrennten Proteine für die 2. Dimension vorzubereiten müssen sie mit SDS behandelt werden. Außerdem werden die Disulfidbrücken der Proteine durch DTT aufgebrochen. Durch Iodacetamid werden die DTT-Reste entfernt und die Cysteine carboxymethyliert. Alle diese Faktoren ermöglichen eine bessere Linearisierung und Auftrennung nach dem Molekulargewicht in der SDS-PAGE.

Die fokussierten Streifen wurden aus der IPGphor entnommen und mit der Gelseite nach oben in ein Kunststoffgefäß gelegt. Dann erfolgte eine Inkubation in Äquilibrier-Lösung mit DTT (10 mg/ml) für 12 min unter leichtem Schütteln. Die Lösung wurde abgenommen und die Äquilibrier-Lösung mit Iodacetamid (500 mg/ml) für weitere 12 min zupipettiert (Görg *et al.*, 1987). Durch Zugabe von etwas Bromphenolblau konnte während der zweiten Dimension die Lauffront des Proteingemisches beobachtet werden.

Äquilibrier-Lösung:

360 g/L Harnstoff

300 g/L Glycerin

20 g/L SDS

11,2 ml/L 1.5 M Tris/HCl pH 8.8

2.8.3. SDS-PAGE (2. Dimension)

Die Proteine werden bei dieser Elektrophorese mit SDS umgeben und erhalten dadurch eine stark negative Ladung, so daß die Nettoladung der Proteine keinen Einfluß mehr hat. Die Proteine wandern im Spannungsfeld je nach Molekülgröße und werden somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Um den aufgetrennten Proteinen später ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde ein Molekulargewichtsstandard (Amersham LMW: 14-94 kD) mit aufgetragen. Zur Durchführung der zweiten Dimension wurden Geräte des Iso-Dalt® Systems von Amersham und SDS-Polyacrylamidgele mit einer Abmessung von 20 x 18 cm verwendet. In dem Dalt Multiple Gel Caster von Hoefer/Amersham wurden 10-15 % ige SDS-Gradientengele gegossen. In dieser Kammer kann man gleichzeitig 22 Gele mittels Hoefer/Amersham Gel Kassetten von 1,5 mm Dicke herstellen. Der verwendete Gradientenmischer (Hoefer/Amersham) wurde mit folgenden Lösungen gefüllt:

	leichte Lösung	schwere Lösung
Acrylamid	357,14 ml	535,71 ml
1.5 M Tris/HCl pH8.8	275,00 ml	275,00 ml
deion. Wasser	443,98 ml	184,37 ml
Glycerin	0 ml	88,00 ml
10 % APS	11 ml	5,5 ml
10 % TEMED	1570 µl	420 µl

Die Verwendung eines Glyceringradienten ermöglicht eine bessere Auspolymerisation der Gele, welche über Nacht mit n- Butanol und SDS-Laufpuffer überschichtet erfolgte. Gelagert wurden die Gele in Plastikwannen zwischen mit Laufpuffer getränkten Papiertüchern.

Zum Starten der 2. Dimension wurden die IPG-Streifen auf das SDS-Gel gelegt und mit 1% iger Agarose (low EEO, Biomol) eingegossen. Die Gele liefen in der Hoefer Iso Dalt-Kammer über Nacht bei 10 °C für 2200-2400 Vh.

2.9. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse wurde alternativ zur N-terminalen Sequenzierung zur Identifizierung der Proteinspots aus 2D-Gelen eingesetzt. Vor allem die Methode des Peptidmassenfingerabdrucks ermöglicht eine schnellere und sensitivere Identifizierung. Hierbei wurden die Proteine mit Trypsin gespalten, eventuell entsalzt und/oder guanidiniert und die Massen der spezifischen Peptide durch MALDI- (matrix assisted laser desorption ionisation) oder ESI-(electrospray ionisation) Q-TOF bestimmt. Diese Peptidmassen sucht man in einer Datenbank, die die translatierte Genomsequenz von *L. monocytogenes* enthält und virtuell mit Trypsin verdaut wurde (Yates *et al.*, 1993, Henzel *et al.*, 1993).

2.9.1. Verdau der Proteine und Elution der Peptide

Aus ein- oder zweidimensionalen Gelen wurden angefärbte Proteinbanden bzw. Proteinspots ausgeschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen. Die Gelstücke wurden 15 min bei Raumtemperatur mit Wasser gewaschen, anschließend 15 min in 50 mM Ammoniumbicarbonat neutralisiert und 15 min in Acetonitril dehydriert. Dann erfolgte ein Eintrocknen der Gelstücke in einem Vacuum-Konzentrator (Bachofer). Die getrockneten Gelstücke wurden mit Verdaulösung rehydriert, mit weiterer Verdaulösung überschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die Peptide aus den Gelstücken zu eluieren, wurden diese in 15 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat für 15 min bei 37 °C geschüttelt und 30 µl Acetonitril für weitere 15 min zugegeben. Der Überstand mit den eluierten Peptiden wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden mit 30 µl 5 % iger Ameisensäure 15 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und erneut 30 µl Acetonitril für 15

min zugegeben. Der Überstand wurden mit dem vorherigen vereinigt und in einem Vacuumkonzentrator eingetrocknet.

2.9.2. Guanidinierung

Bei der Guanidinierung erfolgte eine Modifikation der C-terminalen Lysine zu Homoargininen, die im Vakuum des MALDIs besser fliegen und deutlichere „peaks“ in den Spektren ergeben (Brancia *et al.*, 2000, Beardsley *et al.*, 2000). Die eluierten, eingetrockneten Peptide wurden in 20 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat aufgenommen, 20 µl frisch angesetztes OMI (0.5 M o-Methylisoharnstoff in 50 mM Ammoniumbicarbonat pH 10) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die guanidinierten Peptide wurden wiederholt im Vacuumkonzentrator eingetrocknet.

2.9.3. Aufreinigen und Entsalzen der Peptide („ziptippen“)

Um die Proben aufzureinigen und zu entsalzen, wurden „Ziptips“ (C18 und µC18 von Millipore) verwendet, Pipettenspitzen, die reversed phase Material enthalten. Bei jedem Schritt wurde die Pipette mindestens 5 Mal aufgezogen und entleert, wobei darauf zu achten war, dass das Säulenmaterial nicht trocken bzw. Luft hineingezogen wurde. Die Peptide wurden in 15 µl 5 % Methanol 1 % Ameisensäure resuspendiert. Zur Aktivierung wurden die Ziptips mit 65 % Methanol 1 % Ameisensäure gespült und in 5 % Methanol 1 % Ameisensäure äquilibriert. Dann erfolgte das Beladen des Säulenmaterials mit den Proben durch 10 maliges Herauf- und Herunterpipettieren der Peptid-Lösung. Nach Waschen der Ziptips in 5 % Methanol 1 % Ameisensäure wurden die Peptide mit 5 µl 65 % Methanol 1 % Ameisensäure in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert.

2.9.4. MALDI-TOF

MALDI steht für „matrix assisted laser desorption ionisation“. Hierbei werden tryptische Peptide, die mit einer organischen Matrixsubstanz auf einem Metall-Target Kristalle bilden,

mit einem Laser beschossen. Unter Vakuum werden die Peptidionen im elektrischen Feld beschleunigt und anhand ihrer Flugzeit („time of flight“) die Peptidmassen bestimmt.

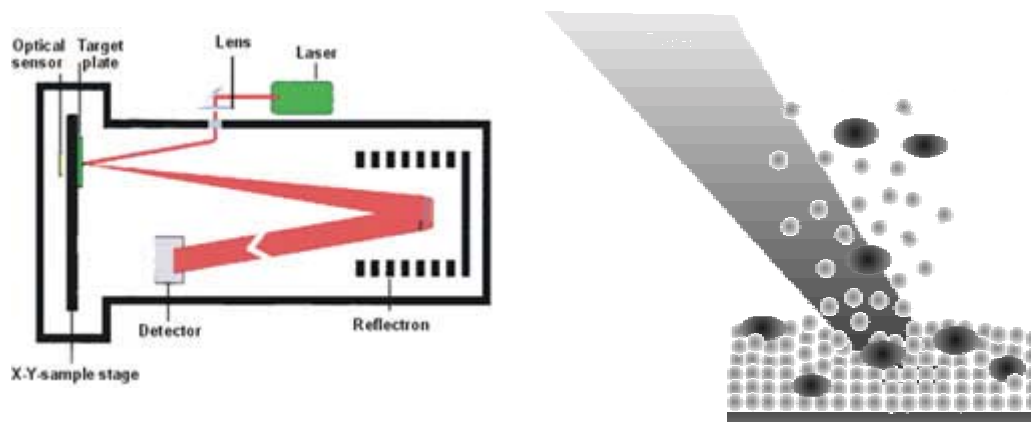


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines MALDI-Massenspektrometers (A) und des Prinzips der Ionisierung und Flugzeitmessung (B).

Für die Messung der Peptide im MALDI wurden 2 μl der aufgereinigten Probe mit 1 μl Matrix-Lösung (8 mg α -Hydroxycyanazimsäure in 65 % Methanol 1 % Ameisensäure) vermischt und auf einen Messpunkt des MALDI-Targets pipettiert. Nach einigen Minuten trockneten die Proben, da die Matrixsubstanz mit den Peptiden kokristallisiert und das Target wurde in das MALDI eingeschleust. Die Messung erfolgte mit dem Ultraflex TOF/TOF von Bruker.

2.9.5. Esi-Q-TOF

Bei der Quadropol „time of flight“ (Q-TOF) Analyse werden die tryptischen Peptide durch Elektrosprayverfahren im elektrischen Feld unter Vakuum beschleunigt und ihre Peptidmassen anhand der Flugzeiten bestimmt. Im Gegensatz zum MALDI-TOF können hier auch Peptide sequenziert werden. Hierfür kann man ein Peptid auswählen und in einer Kollisionskammer durch das Zusammenstoßen mit Argonionen zerbrechen lassen. Den Massenunterschieden der Peptidfragmente kann man dann Aminosäuren zuordnen und so eine Teilsequenz bestimmen.

Für die Messung der Peptide im Q-TOF wurden 1-2 μl der aufgereinigten Peptide in Lösung eingesetzt. Die Messung wurde mit dem Q-TOF II von Micromass durchgeführt.

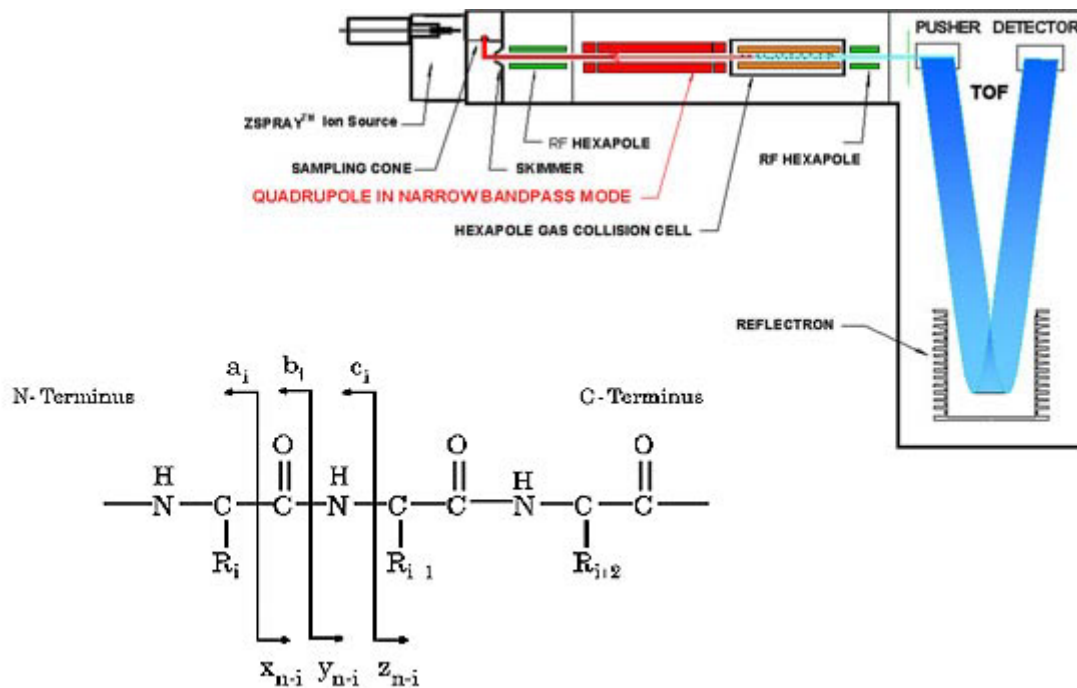


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Q-TOF Massenspektrometers (A) und der Mikrosequenzierung einzelner Peptide.

2.9.6. Auswertung der Massenspektren

Die Auswertung der Massenspektren erfolgte jeweils mit bioinformatischen Methoden auf zwei verschiedenen Wegen.

Die Software “Knexus” bzw. “Sonar“ von Proteometrics ermöglicht eine automatische Proteinidentifikation aus MALDI-bzw. ESI-Q-TOF-Spektren. Mit Hilfe variabler Parameter detektiert das Programm die „peaks“ eines Spektrums und vergleicht diese Peptidmassen und gegebenenfalls eine Aminosäuremikrosequenz mit Datenbanken, die aus NCBI und Swissprot generiert werden. Zusätzlich wurde eine interne Datenbank von *L. monocytogenes* eingebaut. Bei der Zuordnung und Bewertung verwendet die Software den Algorithmus von “ProFound“.

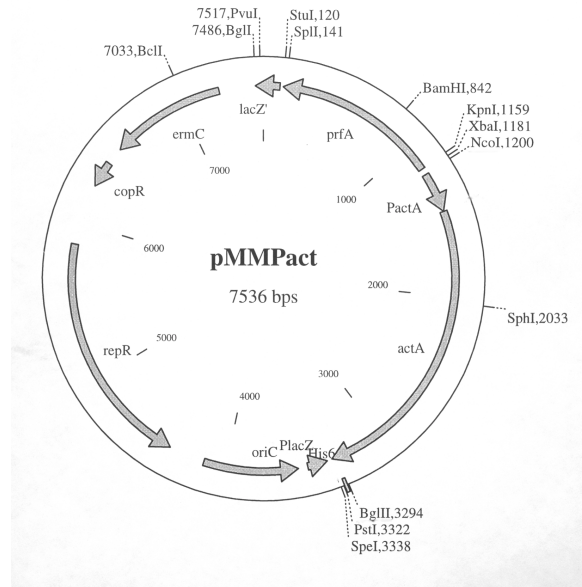
Die Software “Biotools“ von Bruker Daltonics bietet ebenfalls die Möglichkeit die Spektren automatisch auszuwerten. Außerdem läßt sie sich auch mit zusätzlichen Programmen kombinieren, die eine manuelle Bearbeitung der “peak“-Erkennung ermöglicht. Auch hier wurde eine zusätzliche interne *L. monocytogenes*-Datenbank eingerichtet. “Biotools“ benutzt den Algorithmus von Mascot (Matrixscience) bei der Proteinidentifizierung.

Die Verwendung zweier verschiedener Algorithmen bei der Zuordnung der Peptidmassen erhöhen bei übereinstimmenden Ergebnissen die Qualität der Proteinidentifikation.

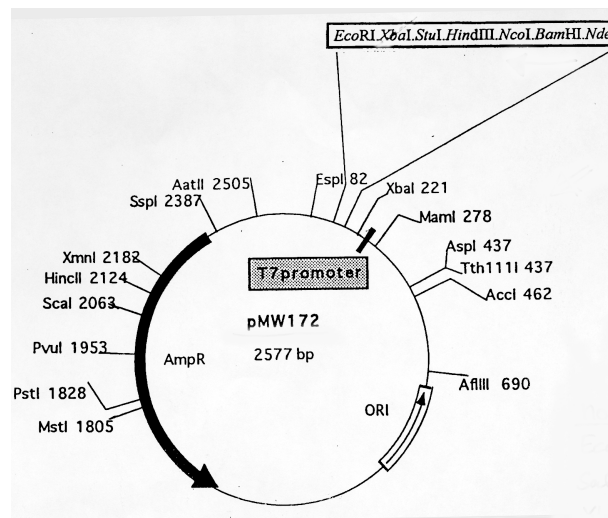
2.10. Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Plasmide

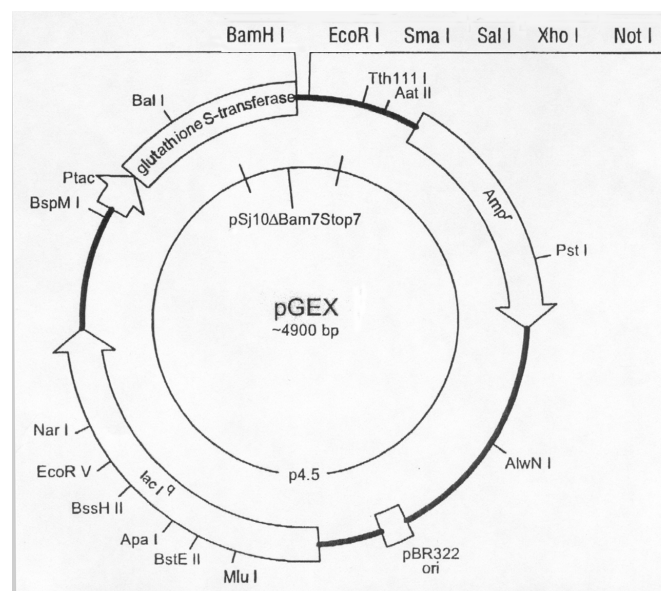
pMM(PactA):



PMW172:



pGEX6-1P:



2.10.2. Oligonukleotide

5'Palp NcoI	GAA GCC CAT GGT CTC AAT GTG
3'AlpBglII	GTC TTT AGA TCT TTG GCT AAA CC
alp SP BglII sense	GAG AAG ATC TAT GAA AAA AAT AAT AGT TGT ATC
alp EcoRI anti Stop	GAG AGA GAA TTC TTA TTT AGC TAA ACC ATC ATG
alp SP NdeI sense	GAG AGA GAC ATA TGA AAA AAA TAA TAG TTG TAT
alp EcoRI anti Stop	GAG AGA GAA TTC TTA TTT AGC TAA ACC ATC ATG

2.10.3. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Sequenzbereichs durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Dabei verwendet man DNA-Moleküle, die die zu amplifizierende Sequenz enthalten, und zwei chemisch spezifisch synthetisierte Oligonukleotide, sowie dNTPs in einem speziellen Puffer. Während der PCR-Zyklen wird im ersten Schritt bei 95 °C das vorliegende DNA-Molekül denaturiert. Die spezifischen Oligonukleotide sind zum amplifizierenden Bereich gegenläufig homolog und können im zweiten Schritt bei 40-65 °C an der Einzelstrang-DNA hybridisieren. Beim dritten Schritt, der Elongation, bindet die DNA-Polymerase bei 72 °C an die Oligonukleotide und synthetisiert einen komplementären DNA-Strang. Durch 25-40 maliges Wiederholen des PCR-Zyklus erreicht man eine exponentielle Vermehrung des DNA-Fragments.

Ein PCR-Ansatz wurde wie folgend zusammen pipettiert:

0,5-1 µg	DNA
2,5 µl	10 x PCR-Puffer
5 µM	Oligonukleotid 1
5 µM	Oligonukleotid 2
0,5 µl	DNA-Polymerase
ad 25 µl	bidest. steriles Wasser

PCR-Programm:

1. 300 sec 95 °C
2. 45 sec 95 °C
3. 45 sec oligonukleotidspezifische Temperatur s.o.
4. 45 sec 72 °C
5. 300 sec 72°C

30 fache Wiederholung der Schritte 2.-4.

2.10.4. TOPO-TA-Klonierung

Um PCR-Produkte sehr schnell direkt nach der PCR-Reaktion in einen Vektor zu klonieren und dieses Konstrukt zu vermehren, wurde das TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) benutzt. Die Taq-DNA-Polymerase synthetisiert am Ende eines PCR-Amplikats einen PolyA-Schwanz, der sich direkt mit dem 3'-T-Überhang des Topo® Vektors ligieren läßt. Der Vektor enthält außerdem flankierende EcoRI Schnittstellen und eine Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz. Für die Reaktion wurden 4 µl frisches PCR-Product mit 1 µl der TOPO® salt solution und 1 µl Topo® Vektor zusammen pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl dieses Ansatzes wurden zu einem Aliquot der One Shot® Chemically Competent E. coli gegeben, vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Für 30 sec wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und in 250 µl SOC-Medium (s.u.) aufgenommen. Nach leichtem Schütteln des Ansatzes bei 37 °C für 1 Stunde wurde der Ansatz auf vorgewärmten LB-Agarplatten (s.o.) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.10.5. DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Moleküle, um einzelne aufzureinigen oder ihre Größe zu kontrollieren, wurde die Agarosegelelektrophorese durchgeführt. DNA-Moleküle sind polyanionisch und wandern somit im elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe zur positiven Elektrode. Mit einem parallel aufgetragenen Marker können die Fragmentgrößen bestimmt werden. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, eines interkalierenden,

fluoreszierenden Farbstoffs, können die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

10 x TAE-Puffer:

2 M	Tris base
1 M	Natriumacetat
50 mM	EDTA pH 7.5

5 x Stop-Puffer:

15 % (v/v)	Ficoll
50 mM	EDTA
0,4 % (w/v)	SDS
10 x TAE-Puffer	
0,05 % (w/v)	Xylenblau
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau

0,8 % (w/v) Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und gelöst. Nach dem Zusatz von Ethidiumbromid (0,25 µg/ml) wurde die Lösung in eine Agarosegelform mit Probentaschen (Gelsystem Mini-Sub®Cell GT von Biorad) gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Proben mit ¼ ihres Volumens von 5 x Stop-Puffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 60 V für ca. 1 Stunde. Die Gele wurden unter UV-Licht ausgewertet und mit dem >>E.A.S.Y.-System<< (Herolab) durch Videoprints dokumentiert.

2.10.6. DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme schneiden DNA an definierten Sequenzstellen. Diese Schnittstellen besitzen eine umliegende spezifische Erkennungssequenz. Durch die Spaltung der Restriktionsenzyme kann man ein bestimmtes Fragment aus einem Plasmid-DNA, chromosomaler DNA oder PCR-Fragmenten ausschneiden und in einen Vektor einfügen. Die Temperatur, Verdaulänge und der Verdau-puffer sind für jedes Enzym spezifisch und vom Hersteller angegeben.

Verwendete Enzyme: BamHI, BglII, EcoRI, NcoI, NdeI von MBI Fermentas

Verdauansatz:

2 µl	10 x Puffer
1 U/µg DNA	Restriktionsenzym
0,5-5 µg	DNA
ad 20 µl	bidest. Wasser

2.10.7. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um beim Klonieren zu verhindern, daß sich DNA-Moleküle ungewollt miteinander verbinden, verändert man die Enden der DNA-Fragmente durch die alkalische Phosphatase aus Rinderdarm (CIP). Dieses Enzym trennt eine Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA ab und verhindert so z.B. eine Religation des Vektors.

CIP-Ansatz:

2.10.8. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente dient der Entfernung von Enzymen und anderer überflüssiger Moleküle nach PCR, Restriktion oder Ligation. Hierfür wurden zwei Methoden angewandt. Die Aufreinigung mit dem QIAquick® Kit (Qiagen) für PCR-Fragmente und Restriktionsansätze. Hierbei wurden 5 Volumenteile Puffer PB zu dem Ansatz gegeben und die Mischung auf eine QIAquick® Mini Column pipettiert. Nach einer Zentrifugation für 60 sec und 13.000 x g wurde der Durchfluß verworfen und das Säulenmaterial mit der gebundenen DNA mit 750 µl Puffer PE durch erneutes Zentrifugieren gewaschen. Der Durchfluß wurde wieder verworfen und die Säulen leer noch einmal zentrifugiert, um letzte Pufferreste zu entfernen. Zur Elution wurden 30 ml bidest. Wasser auf die Säulen gegeben, diese auf frische 1,5 ml Reaktionsgefäße gesetzt und bei 13.000 x g 60 sec zentrifugiert.

Für einige Restriktionsansätze wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe der QIAquick® gel extraction kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel eluiert. Dafür wurde unter UV-Licht eine DNA-Bande aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in seinem 3 fachen Volumen Puffer QX-1 bei 50 °C kräftig geschüttelt und aufgelöst. Die

Suspension wurde auf QIAquick®-Spin-Säulen gegeben und bei 13.000 x g 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die auf der Säule gebundene DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 30 µl bidest. Wasser durch 1 minütiges Zentrifugieren bei 13.000 x g eluiert.

2.10.9. Ligation

Die DNA-Ligase repariert in der Zelle aufgebrochene Phosphodiesterbindungen, die spontan oder bei DNA-Replikation oder –rekombination auftreten. In der Molekulargenetik wird dieses Enzym gezielt zur Verbindung von DNA-Fragmenten, z.B. einem PCR-Amplifikat und einem Vektor, eingesetzt.

Hierbei wurden die entsprechend Plasmid-DNA mit dem passend geschnittenen PCR-Produkt im Verhältnis 1:3 gemischt, Ligationspuffer und bidest. Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 25 µl zugegeben und mit 0,5 µl T4-Ligase (MBI Fermentas) versetzt. Die Ligation wurde bei 10 °C über Nacht durchgeführt.

2.10.10. Transformation in *E.coli*

Um die Plasmide mit der neu kombinierten DNA in Wirtszellen einzuschleusen wird die chemische Transformation bei kompetenten *E. coli*-Zellen angewandt.

Hierfür mußten als erstes kompetente *E. coli*-Zellen hergestellt werden. *E. coli* TG2 wurde über Nacht in SOB-Medium bei 30 °C und 180 rpm angezogen. Die Übernachtskultur wurde 1:50 mit SOB-Medium verdünnt und bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 x g wurden die Bakterien gerntet und in eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert und in eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen. Es folgte eine Inkubation von ca. 8 h auf Eis und das Aliquotieren mit 10 % Glycerin zur Lagerung bei –70 °C.

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien mit 0,5 µg Plasmid oder 7 µl Ligationsansatz für 15 min. auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Erwärmen des Ansatzes auf 37 °C für 5 min Dieser Temperaturwechsel wurde wiederholt und der Ansatz abschließend noch einmal für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden die Bakterien in 800 µl

SOC-Medium 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 1 min zentrifugieren bei 13.000 x g wurden 600 µl Medium abgenommen und der Rest resuspendiert auf Selektivmedium-Agarplatten mit Antibiotika ausplattiert. Die Platten im Brutschrank wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.10.11. Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham) verwendet. Mit den über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien aus dem Transformationsansatz wurden Übernachtskulturen in 5 ml LB-Medium mit Antibiotika angezogen. 1-3 ml dieser Kulturen wurden für 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 150 µl Lösung I sorgfältig resuspendiert. 150 µl Lösung II wurden dazu pipettiert und der Ansatz durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gut gemischt. Ebenso wurden 300 µl Lösung III hinzugegeben und der Ansatz 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und auf die GFX columns/Säulen pipettiert. Die Säulen wurden auf collection tubes/Sammelgefäße[?] gesetzt und 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Dabei band die DNA an das Säulenmaterial und wurde durch Zugabe von 750 µl Wash Buffer und erneuter zentrifugation gewaschen. Zur Elution wurden die Säulen auf neue Reaktionsgefäße gesetzt und 33 µl bidest. Wasser auf die Säule pipettiert. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden sie bei 13.000 x g für 1 min zentrifugiert und das Eluat bei -20 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Plasmid-Konzentration erfolgte entweder durch Messung der OD bei 280 nm [$(OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50) / 1000 = \text{DNA-Menge in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$] oder durch vergleichendes Abschätzen im Agarosegel mit dem SmartLadder-Standard von Eurogentec.

2.10.12. DNA-Sequenzierung

Um die klonierten DNA-Sequenzen zu überprüfen, wurden sie mit Hilfe des BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits von Applied Biosystems und der Firma GATC sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion beruht auf der Dideoxy-Methode von Sanger, bei der die DNA-Stränge über PCR amplifiziert werden. Im Gegensatz zur normalen PCR werden hier

neben den Desoxynucleosidtriphosphaten auch Didesoxynucleosidtriphosphate eingebaut. Diese sind modifiziert und fluoreszenzmarkiert, so daß sie zu einem Abbruch der DNA-Synthese führen. Durch zufälligen Einbau dieser Terminatoren entstehen unterschiedliche lange DNA-Moleküle, die durch hochauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden. Diese Elektrophorese und die Analyse der entsprechenden fluoreszierenden Terminatoren durch eine Laserdiode wurde von der Firma GATC übernommen. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen wurden mit den Programmen ABI Sequencing Analysis Version 3.2 DNA star (Lasergene) vorgenommen.

Reaktionsansatz

2 µl Big Dye Premix

1 µg DNA

1,6 pmol Primer

ad 10 µl bidest. Wasser

PCR-Sequenzierprogramm:

1. 95 °C 15 sec
2. 50 °C 15 sec
3. 62 °C 240 sec
4. 62 °C 300 sec

Die Schritte 1.-3. Wurden 25 mal wiederholt.

2.11. Herstellung polyklonaler Antikörper

2.11.1. Immunisierung

Zur Immunisierung gegen die Proteine P70 und Alp von *L. monocytogenes* wurden Peptide dieser Proteine synthetisiert. Die Auswahl der Peptidsequenz fiel jeweils auf den N-Terminus ohne Signalsequenz und einen mittleren möglichst nicht hydrophoben Teil. Folgende Peptide wurden von der Arbeitsgruppe MERK an der GBF von Werner Tegge hergestellt:

P70-1 DETAPADEASKSAEANC(SH)

P70-2 STTSDTNTSKPSTGTC(SH)

Alp-1 SSQNSDSKKTDGKLC(SH)
Alp-2 YIDKLATLDKEAKQKC(SH)

Die Peptide wurden an Ovalbumin gekoppelt mit Hilfe des Imject®Maleimide activated Ovalbumin von der Firma Pierce. Hierbei wurden einfach und stabil Hapten-Träger-Konjugate für die Immunisierung hergetellt. 2 mg Peptide wurden in 2 ml des Maleimid aktivierten Ovalbumins (10 mg/ml) suspendiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Immunisierung mit diesen Proben wurde von der Firma EUROGENTEC in Belgien durchgeführt.

Immunisierungsplan:

- 1. Injektion 1.Tag
- 2. Injektion 14. Tag
- 3. Injektion 28. Tag
- 4. Injektion 56. Tag

Wir erhielten Praeimmunserum vom 1. Tag, eine kleine Blutprobe vom 35. Tag, eine große Blutprobe vom 66. Tag und das finale Serum vom 90. Tag.

2.11.2. Aufreinigung polyklonaler Seren

Um aus dem polyklonalen Seren die Antikörper aufzureinigen wurden die Antigen-Peptide an CNBr-Sepharose 4B gekoppelt. Dafür wurde 1 g der Sepharose mit 100 ml bidest. Wasser, 200 ml 5 mM HCL und anschließend mit 200 ml Boratpuffer gewaschen. 1 mg Peptid wurde in Boratpuffer gelöst und mit der Sepharose bei 4 °C im Überkopfschüttler über Nacht inkubiert, um an das Säulenmaterial zu binden. Die Sepharose mit dem gebundenen Peptid wurde bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert und 3 mal mit 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 gewaschen. Anschließend wurde das Säulenmaterial eine Stunde mit dem Trispuffer über Kopf geschüttelt. Das Serum wurde abzentrifugiert um Schwebeteilchen zu entfernen, die später die Säule verstopfen könnten. Dann wurde das Serum mit dem Säulenmaterial bei 4 °C im Überkopfschüttler über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Sepharose mit dem gebundenen Peptid und Antikörpern in PD-10-Säulen gefüllt und erneut

mit 100 ml PBS gründlich gespült. Die Elution erfolgte mit 0.1 M Glycin-HCl pH 2.7. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt, wobei in jedes Reaktionsgefäß 100 µl 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 zum Neutralisieren vorgelegt wurden. Die Proteinmenge der Fractionen wurde bei einer OD von 280 nm bestimmt und nur Fractionen mit einer OD > 0,06 gepoolt und weiter in Zentricons (Millipore) aufkonzentriert.

2.12. Herstellung monoklonaler Antikörper

2.12.1. Immunisierung

Die Immunisierung mit den oben aufgeführten Peptiden (2.11.1) erfolgte in ca. 10 Wochen alten BALB/c Mäusen (Harlan-Winkelmann). Den Mäusen wurde 50 µl Antigenlösung (5-10 µg Antigen) in die Hinterläufe injiziert. Die Immunisierung erfolgte 17 Tage mit komplettem Freud'schen Adjuvants (CFA, Sigma) und 14 Tage mit inkompletten Freud'schen Adjuvants (IFA, Sigma). 10, 7, 4 und einen Tag vor der Zellfusion wurde Antigen in PBS gelöst gespritzt.

2.12.2. Zellfusion

Hypoxanthin-Azaserin-Selektionsmedium :

OPTIMEM (Gibco) mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin (Gibco), 50 µg/mL Streptomycin (Gibco), 20 mg/L Hypoxanthin (Sigma), 1,5 mg/L (Sigma)

Die Mäuse wurden mit CO₂ getötet und durch Eintauchen in 70 % Ethanol weitgehend sterilisiert. An den Hinterläufen wurden die angeschwollenen Lymphknoten herauspräpariert und durch Waschen in warmen Kulturmedium OPTIMEM (Gibco) Reste von Bindegewebe und Muskulatur entfernt. Nach Aufschneiden der Lymphknoten wurden die Lymphozyten mit Hilfe von sterilen Objektträgern herausgerieben. Die Lymphozyten wurden in OPTIMEM-Kulturmedium aufgenommen und 5 min bei 1000 Upm (Hettich, Rotanta/AP) zentrifugiert. Parallel hierzu wurden murine Ag8-Myelomzellen auf 12 Petrischalen bis zu einer Zelldichte von 4×10^8 Zellen angezüchtet. Durch Zentrifugation bei 1000 Upm (Hettich, Rotante/AP) für 5 min wurden die Zellen geerntet und mit DMEM-Medium mit 25 mM Hepes gewaschen.

Außerdem wurden auf 24 Lochplatten (Nunc) Makrophagen aus der Peritonealhöhle einer Maus in Hypoxanthin-Azaserin (HA)-Selektionsmedium ausgesät. Hierfür wurde der Maus eiskaltes OPTIMEM-Kulturmedium in die Peritonealhöhle gespritzt, einmassiert und wieder herausgesaugt.

Die Ag8-Myelomzellen wurden in DMEM-Medium mit 25 mM Hepes aufgenommen und auf das Lymphozytenpellet pipettiert. Nach Resuspension wurden die Zellen erneut bei 100 Upm (Hettich, Rotanta/AP) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Röhrchen mit dem Pellet leicht geschüttelt und in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Nun wurde innerhalb einer Minute 1 ml PEG-Lösung (Polyethylenglycol 4000) auf das Pellet getropft und erneut leicht geschüttelt. Nach einer Minute wurde DMEM-Medium mit 25 mM Hepes zugegeben: in den ersten 30 sec 1 ml, in weiteren 30 sec 3 ml und schließlich in 1 min 16 ml. Es folgte eine Inkubation der Röhrchen bei 37 °C im Wasserbad für 5 min. Nach einer Zentrifugation bei 800 Upm (Hettich, Rotanta/AP) für 5 min wurde das Pellet in HA-Selektionsmedium aufgenommen und auf den 24 Loch-Platten (Nunc) mit den Peritonealmakrophagen verteilt. Nach Inkubation von 3 Tagen bei 37 °C und 7.5 % CO₂ wurde das HA-Selektionsmedium gewechselt. Nach 10 Tagen wurden die Überstände für weitere Analysen abgenommen. Bei positiven Ergebnissen der Klone in ELISA und Westernblot wurden sie in 6 Lochplatten (Nunc) überführt und weiter inkubiert.

2.12.3. ELISA

Um die Bindung der Antikörper an ein Antigen zu testen wurde der “Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) durchgeführt. Hierfür verwendet man 96-Lochplatten wie Maxi-oder Polysorp von Nunc, die durch spezielle Beschichtung Peptide und Proteine binden. Grundsätzlich können diese Platten mit Antikörper oder Antigen beschichtet werden. Zur Detektion der Bindung wird später ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, der bei Substratzugabe eine quantifizierbare Farbreaktion zeigt.

Für das Testen der Einzel- und Mischklone aus der Zellfusion wurden 1 mg/ml der synthetisierten Peptide in 0.1 M NaHCO₃- Puffer pH 9.6 gelöst und je 50 µl pro Vertiefung auf der 96-Lochplatte pipettiert. Um die Peptide an die Platte adsorbieren zu lassen, wurden diese darin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde ausgeschlagen und mit je 100 µl 10 % FCS in PBS innerhalb einer Stunde bei 37 °C die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden je 100 µl der Zellfusionsüberstände

oder der Antikörperlösung in die Vertiefungen pipettiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit je 100 µl der Sekundärantikörperlösung (A4a anti Maus 1:200 verdünnt, Dianova) für 30 min bei 37 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 200 µl Substrat-Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Die Farbreaktion wurde nach 5-15 min durch je 50 µl 2.5 M H₂SO₄ gestoppt. Die Quantifizierung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte bei 490 nm im "Microplate Reader" von BioRad (Modell 3550).

Substrat-Lösung:

6,25 ml	0.1 M Zitronensäure
6,25 ml	0.2 M Na ₂ HPO ₄
12,5 ml	bidest. Wasser
10 mg	o-Phenyldiamin
20 µl	H ₂ O ₂

2.12.4. Subklonierung

Bei der Subklonierung sollen die Zellen einer Fusion soweit verdünnt werden, daß sie einzeln in einem Loch einer Inkubationsplatte für weitere Tests vorliegen. Hierfür wurden die Zellen eines Lochs resuspendiert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Es wurden Verdünnungen von 1000, 500, 100, 10 und 5 Zellen/ml hergestellt. Beim Aussäen wurden je 100 µl in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte mit Makrophagen gegeben, so daß nach statistischer Verteilung nun 100, 50, 10, 1 und 0,1 Zellen/Loch vorliegen. Nach 10-14 Tagen wurden die Überstände der einzelnen Klone abgenommen und auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörper getestet (ELISA).

2.12.5. Subklassentest

Zur Klassifizierung der Immunglobuline der einzelnen monoklonalen Antikörper wurde ein Subklassentest durch ELISA durchgeführt. Wie in 2.12.3 beschrieben wurden die 96-Lochplatten (Nunc) mit Antigen beschichtet und den Zellüberständen inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden für die verschiedenen Mausimmunglobulinsubklassen spezifische

Antikörper verwendet (Medag, Hamburg). Sie sind Peroxidase-gekoppelt und reagieren entweder gegen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 oder IgM. Verwendet wurden Klone der IgG-Subklasse, da IgM aufgrund ihrer Pentamerbildung schwierig aufzureinigen sind und die Antikörper außerdem instabiler sind.

2.12.6. Massenkultivierung von Hybridomzellen

Um größere Mengen an monoklonalem Antikörper herzustellen, wurden große Mengen an Kulturüberstand gewonnen. Die Antikörperproduktion steigt proportional mit der Zelldichte und der Vitalität der Zellen. Um alle Faktoren möglichst optimal zu kombinieren, wurden sogenannte Rollkulturen angesetzt. Hierfür wurden die Hybridomzellklone bei einer Zelldichte von 10^8 Zellen in eine 2 Literflasche (Schott) umgesetzt und mit 200 ml Medium bei 37 °C und 8 % CO₂ auf einer Rollkulturanlage (Heraeus) inkubiert. Nach 7 Tagen erfolgte ein Auffüllen auf 400 ml Medium und die Inkubation für eine weitere Woche.

2.13. Blau Native Gelelektrophorese (BN)

Mit der SDS-PAGE nach Laemmli können vor allem hydrophilen Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden. Das Blau Native System wurde als eine Standardmethode zur Auftrennung von Proteinkomplexen mit hydrophoben Bestandteilen unter nativen Bedingungen entwickelt (Schägger *et al.*, 1991). Die Proteinkomplexe werden für die Elektrophorese durch Coomassie negativ geladen während ihre native Form erhalten bleibt. Mit Hilfe von nichtionischen Detergenzien erfolgt im Polyacrylamidgel eine Auftrennung der Proteinkomplexe nach ihrem Gesamtmolekulargewicht. Anschließend erfolgt eine denaturierende Tricin-Gelelektrophorese als zweite Dimension, wobei die Bestandteile der Proteinkomplex nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

2.13.1. Herstellung von Membranextrakten und Probenvorbereitung für BN

ACA-Puffer: 750 mM 6-Aminocapronsäure

50 mM Bis-Tris pH 7.0

0,5 mM EDTA

Eine Übernachtskultur von *L. monocytogenes* wurde in 300 ml BHI angezogen. Die Zellen wurden bei 3.000 x g abzentrifugiert und mit 100 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 8 ml 0,5 M Saccharose aufgenommen und 1 Tablette Complete Mini complete® (Proteaseinhibitoren von Roche) darin gelöst. Von nun an fanden alle weiteren Schritte auf Eis oder im Kühlraum bei 4 °C statt. Das Aufschließen der suspendierten Zellen erfolgte mit Hilfe der French Press (SLM Aminco). Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 4.000 x g wurde der Überstand für 45 Minuten bei 27.000 x g ultrazentrifugiert. Dabei bildet sich im Saccharosegradienten eine deutliche Bande, die die Membranfraktion enthält. Diese Bande wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in eine neues Reaktionsgefäß überführt und auf 15 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt. Nach einer erneuten Ultrazentrifugation bei 27.000 x g für eine Stunde wurde das Pellet, welches die Membranproteine enthielt mit 180 µl ACA-Puffer versetzt und 45 µl 10 % Laurylmaltosid zugefügt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 20 Minuten um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Vom Überstand wurden jeweils 50 µl mit 15 µl 5 % Coomassie G-250 versetzt.

2.13.2. Blau Native Gelelektrophorese (1.Dimension)

6 x Gelpuffer: 1,29 M 6-Aminocapronsäure

150 mM Bis-Tris pH 7.0

Trenngel:	Gellösung 1:	Gellösung 2:
Bidest. Wasser	15,4 ml	6,0 ml
6 x Gelpuffer	3,5 ml	3,0 ml
Acrylamid	2,1 ml	6,0 ml
Glycerin		3,5 ml
10 % APS	95 µl	61 µl
TEMED	9,5 µl	6,1 µl

5 x Kathodenpuffer: 250 mM Tricin

75 mM Bis-Tris pH 7

0,1 % Serva blue 6

6 x Anodenpuffer: 300 mM Bis-Tris pH 7

Alle Lösungen wurden gekühlt und die folgenden Schritte bei 4 °C durchgeführt. In einen Gradientenformers (Amersham) wurden in die vordere Kammer Die Gellösung 1 und in die hintere Kammer die Gellösung 2 gefüllt und zwischen die Glasplatten im Gelgießstand des ProteanTM II System von Biorad (160 x 180 x 15 mm) geleitet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Sammelgel mit einem Probentaschenkamm darauf gegossen. Die Auftrennung der Membranextrakte erfolgte für 1,5 Stunden bei 100 V und anschließenden 6,5 Stunden bei 15 mA im ProteanTM II System von Biorad.

2.13.3. Tricin-Gelelektrophorese (2. Dimension)

Gelpuffer:

	Trenngel:	Spacergel:	Probengel:
Acrylamid/Bisacrylamid	48 ml	10,1 ml	3,2 ml
Gelpuffer	30 ml	10 ml	6,2 ml
Glycerin	12 ml		
Bidest. Wasser		9,9 ml	16,8 ml
10 % APS	300 µl	100 µl	200 µl
TEMED	30 µl	10 µl	20 µl

Anodenpuffer: 0.2 M Tris base pH 8.9

Kathodenpuffer: 0.1 M Tris base

M Tricin

0.1 % SDS

Im ProteanTM II System von Biorad wurden erst das Trenngel und darauf das Spacergel gegossen. Die Gelbahn mit der im Blue Native System aufgetrennten Probe wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und ca. 2 cm über dem Spacergel mit Hilfe des Probengels eingegossen. Die Elektrophorese lief bei 4 °C anfangs bei 100 V für 45 min und anschließend bei 15 mA (max. 500 V) für sechs Stunden.

2.14. Radioaktives Markieren von Lipoproteinen

Lipidmodifizierungen bei Proteinen wurden durch radioaktive Fettsäuren nachgewiesen, die von den Bakterien eingebaut wurden und anschließend detektierbar sind.

10 ml BHI-Medium wurden mit einer Vorkultur von *L. monocytogenes* angeimpft und auf eine Ausgangs-OD von 0,1 eingestellt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD von 0,4. Nach Zugabe von 250 µCi ³H-Palmitinsäure (Amersham) wurde die Kultur bis zu einer OD von 0,8 weiterinkubiert. Die Zellen wurden bei 4000 x g für 15 min abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Durch Aufnahme in 2 ml Protoplastenpuffer und Zugabe des Phagenlysin (siehe 2.6.2) wurden Protoplasten regeneriert und mit 2 ml bidest. Wasser, sowie einer Tablette CompleteMini (Roche) und 0,3 µl Mercaptoethanol gemischt. Der Extrakt wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 x gepottert. Mit einer Ultrazentrifugation bei 96.600 x g, bei 4 °C für 20 min wurden die Zellwand- und Membranbruchstücke pelletiert und mit Verdauopuffer (siehe 2.6.2) ohne Sucrose gewaschen. Das Pellet wurde in 2 ml bidest. Wasser resuspendiert und mit 4 ml Methanol gut vermischt. Es folgte die Zugabe von 1 ml Chloroform, erneutes Mischen und mit 3 ml bidest. Wasser eine Inkubation für 10 min auf Eis. Nach Zentrifugation für 30 min bei 3.300 x g und 4 °C teilte sich der Extrakt durch die Chloroform-Methanol-Fällung in zwei Phasen auf. Die obere hydrophobe Phase enthielt die Lipoproteine und wird vorsichtig abgenommen. Diese wurde mit 3 ml Methanol vermischt und wiederholt zentrifugiert. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer ohne Mercaptoethanol aufgenommen und für 10 bei 95 °C erhitzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Extrakte in SDS-Gele (siehe 2.7.3) erfolgte ein Transfer auf PVDF-Membran (siehe 2.7.5). Die Detektion der Proteine, die Palmitinsäure eingebaut haben und jetzt radioaktiv sind, wurde mit Hilfe eines TLC-Scanners (tracemaster20 von berthold) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Identifizierung von Oberflächenproteinen von *Listeria monocytogenes*

Im Infektionszyklus von *L. monocytogenes* spielen bei den Schritten der Adhäsion und Invasion die Proteine der Zellwand eine wichtige Rolle. Sie ermöglichen dem intrazellulären Erreger den spezifischen Kontakt zur Wirtszelle. Essentiell für diesen Vorgang sind die Zellwand-assoziierten Internaline. Auf der Suche nach neuen Oberflächenproteinen wurden Methoden zur Isolierung der Zellwand-assoziierten und Membran-ständigen Proteine bei *L. monocytogenes* entwickelt: die serielle Extraktion und die endolytische Protoplastierung. Die Auftrennung erfolgte durch ein- oder zweidimensionale Gelelektrophoresen und massenspektrometrische Untersuchungen. Dabei sollten vor allem die dominantesten Proteine, die die Bakterien ihrer Umwelt und mutmaßlichen Interaktionspartnern präsentieren, identifiziert und charakterisiert werden. Die Qualität der durch verschiedene Ansätze hergestellten Subproteome und deren Abgrenzung vom Zytosol wurde durch die Etablierung eines Enzymtests überprüft. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit identifizierten Proteine befindet sich im Anhang (Tabelle 8.1).

3.1.1. Serielle Extraktion Zellwand-assoziiierter Proteine

Ziel der seriellen Extraktion war vor allem nicht-kovalent gebundene Proteine der Zellwand zu solubilisieren. Dazu wurden verschiedene Puffer, Salze und Detergenzien getestet und aufeinanderfolgend eingesetzt, um durch unterschiedliche Aggressivität und Stringenz der Substanzen komplementierende Fraktionen zu generieren. Die Bakterienzellen sollten dabei weitestgehend intakt bleiben. Zudem lies die zu vermutete geringere Komplexität der einzelnen Extrakte eine bessere Auflösung bei der Gelelektrophorese erwarten und erhöhte somit die Signifikanz der Proteinidentifikation. Als erster Schritt wurde 1 M Tris-Cl pH 7.5 zur Solubilisierung der Oberflächenproteine eingesetzt. Dieser Puffer war bereits von Simone Müller in ihrer Doktorarbeit verwendet worden, um Internalin B aus *L. monocytogenes* anzureichern (Mueller *et al.*, 1998). Der zweite Schritt der seriellen Extraktion wurde mit 1 M KSCN, einem chaotropen Salz durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die Extraktion mit dem zwitterionischen Detergenz CHAPS und dem nichtionischen Detergenz Octylglucosid.

Ebenso wurden CTAB, ein kationisches, und SDS, ein anionisches Detergenz zur Solubilisierung der Oberflächenproteine verwendet (siehe Abbildung 3.1). Vor allem die Tris- und KSCN-Extraktion erwies sich effizient und am besten geeignet um die oben genannten Bedingungen zu erfüllen. Beide Extrakte zeigten ein abweichendes Bandenmuster, was auch auf die Erhaltung der Integrität der Bakterienzellen hindeutet. Die folgenden Fraktionen aus der CHAPS-, Octylglucosid-, CTAB- und SDS-Extraktionen wiesen ein fast identisches Proteinmuster und eine für die MS-Analyse zu hohe Komplexität auf.

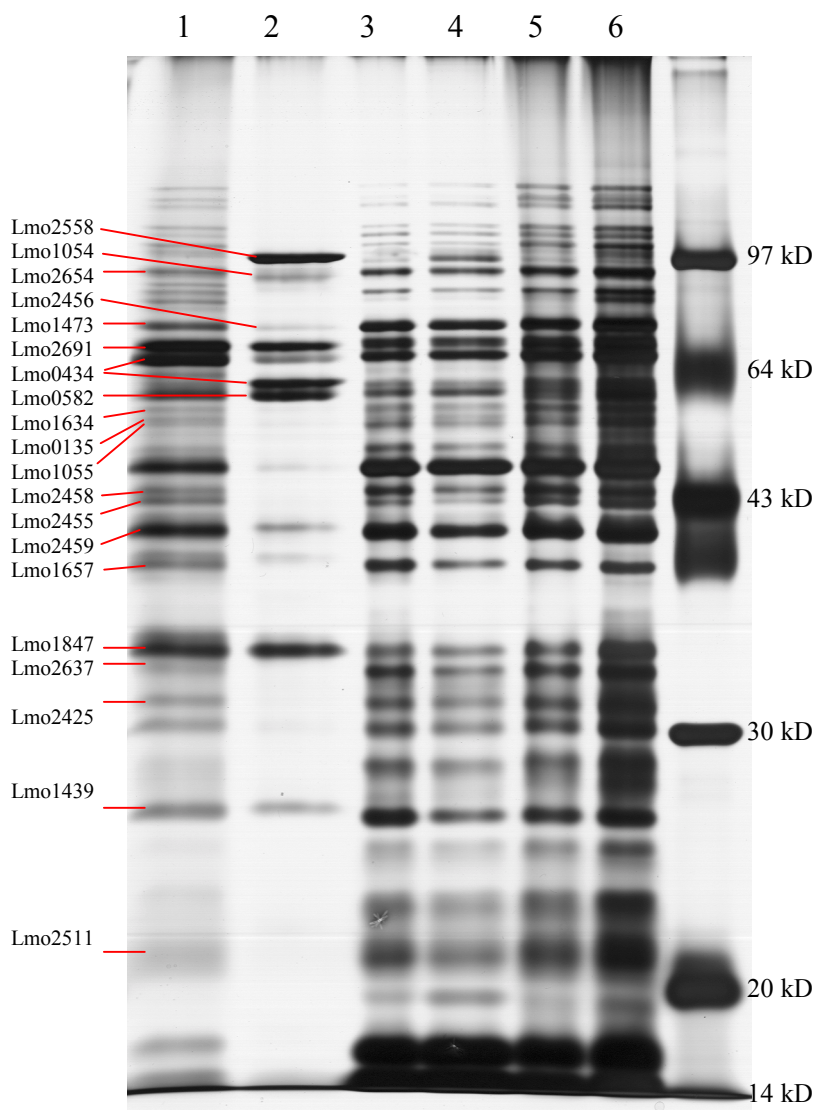


Abbildung 3.1 :

Serielle Extraktion von zellwandassoziierten Proteinen von *L. monocytogenes*. Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel.

Bahn 1: 1 M Tris pH 7.5

Bahn 2: 1 M KSCN

Bahn 3: 1 % CHAPS

Bahn 4: 1 % Octylglucosid

Bahn 5: 1 % CTAB

Bahn 6: 0.5 % SDS

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit entschieden, die Tris- und KSCN-Extrakte für weitere Analysen zu verwenden. Diese seriellen Fraktionen wurden elektrophoretisch eindimensional aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und Coomassie gefärbt (nicht

gezeigt). Die Identifikation wurde mittels N-terminaler Sequenzierung vorgenommen. Dadurch konnten Hinweise auf vermutlich abgespaltene vorhersagbare Signalpeptide am N-Terminus und eine Zellwand-assoziierte Lokalisation erhalten werden. Insgesamt war es möglich, von den ca. 40 mit Coomassie anfärbbaren Proteinbanden 22 zu identifizieren (siehe Tabelle 3.1). Nicht identifizierte Banden stellen wahrscheinlich N-terminal blockierte Proteine oder ein nicht auftrennbares Gemisch dar.

Tabelle 3.1: Aus Oberflächenproteinextrakten identifizierte Proteine von *L. monocytogenes*. Die Extraktion erfolgte durch Inkubation mit 1 M Tris pH 7.5 und 1 M KSCN. Nach Auftrennung im SDS-Gel erfolgte Blotten auf PVDF-Membran, Coomassie-Färbung und N-terminale Sequenzierung der Banden. MG = theoretisches Molekulargewicht, SP = anhand der Genomsequenz vorhergesagtes und im Experiment bestätigtes Signalpeptid

<i>N-term. Sequenz</i>	<i>Gen</i>	<i>Funktion</i>	SP
CGGSGASSDKANG	Lmo0135	Oligopeptid-Bindeprotein (ABC Transporter)	Ja
ETITVPTPIKQI	Lmo0434	InlB, Internalin B	Ja
ETITVPTPIKQI	Lmo0434	InlB, Internalin B	Ja
TVVVEAGDTLWGIAQ	Lmo0582	Iap (P60), Invasionsassoziiertes Protein	Ja
AYSFKLPDIGEPI	Lmo1054	PdhC, Pyruvatdehydrogenase (E2)	Nein
VVGDFPSEKDTIVIG	Lmo1055	PdhD, Pyruvatdehydrogenase (E3)	Nein
MTYELPKLPYTYDALE	Lmo1439	Sod, Superoxiddismutase	Nein
SKIITGIDLGTN	Lmo1473	DnaK, molekulares Chaperon	Nein
AIKENAAQEVLEVQK	Lmo1634	Alkoholacetaldehyd Dehydrogenase	Nein
ANITAMVMKELREKT	Lmo1657	Tsf, Translationselongationsfaktor	Nein
CSSQNSDSKKTG	Lmo1847	Adhäsionsbindeprotein, Lipoprotein (ABC Transp.)	Ja
AKDIKFSEDA	Lmo2068	GroEL, Chaperonin	Nein
SLPKDLLYTEEH	Lmo2425	Glycinspaltungssystem Protein H	Nein
SIITEVYAREVL	Lmo2455	Eno, Enolase	Nein
SKSPVAIILGDGF	Lmo2456	Pgm, Phosphoglyceratmutase	Nein
AKKVVTDLDLKD	Lmo2458	Pgk, Phosphoglyceratkinase	Nein
TVKVGINGFGR	Lmo2459	Gap, Glyceraldehyd-3 Phosphatdehydrogenase	Nein
MLKYNIRGENIEV	Lmo2511	konserviertes hypothetisches Protein	Nein
SIDPVQKTD	Lmo2558	Ami, Autolysin, Amidase	Ja
CGSSDDSSKDK	Lmo2637	konserviertes Lipoprotein	Ja
AREFSLEKTRNIG	Lmo2654	Fus, Translationselongationsfaktor G	Nein
DETAPADEASKSAEA	Lmo2691	Autolysin, N-Acetylmuramidase	Ja

Bei acht dieser identifizierten Proteine begann der N-Terminus nicht mit der Sequenz, die in der genomischen Annotierung zu finden ist. Bei diesen Proteinen war die mit SignalP (www.expasy.ch) vorhersagbare Signalsequenz (SP) abgespalten worden, was eine Lokalisation an der Zelloberfläche bestätigte. Allerdings stimmte nur bei den Proteinen Lmo2691, Lmo0582 und Lmo 2558 die vorhergesagte Spaltungsstelle für die Signalpeptidase

II mit dem gefundenen N-Terminus überein. Internalin B (Lmo0434) wurde mit zwei verschiedenen Molekulargewichten, aber dem gleichen N-Terminus ETITVPTPIKQI gefunden, der im Gegensatz zu der Vorhersage in der Swissprot-Datenbank steht. Die in dieser Arbeit vorgefundene Spaltungsstelle wurde jedoch ebenfalls von Dramsi und Kollegen 1995 publiziert. Bei den drei Lipoproteinen Lmo1847, Lmo2637 und Lmo0135 wurden ebenfalls N-Termini gefunden, die nicht mit der vorhergesagten Spaltungsstelle der Signalpeptide übereinstimmen. Prozessierte Lipoproteine besitzen immer ein N-terminales Cystein, an dem die charakteristischen Komponenten Diglycerid und Fettsäuren gebunden sind. Ein Cystein stellte in allen drei Fällen die erste Aminosäure dar und bestätigt die hier gefundenen prozessierten N-Termini. Bei den Proteinen, in denen keine Signalsequenz vermutet wird, wurde als erste Aminosäure ein Methionin erwartet. Dieses konnte allerdings nur bei den Proteinen Lmo1439 und Lmo2511 detektiert werden. Die Abspaltung des N-terminalen Methionins kann durch die Methioninaminopeptidase PepM erfolgen. Bachmair und Kollegen (1986) sowie Tobias und Kollegen (1991) veröffentlichten ähnliche Beobachtungen bei *S. cerevisiae* und *E. coli* und vermuten eine Bedeutung für die Stabilität eines Proteins (siehe Diskussion). Unter den Proteinen ohne Signalsequenz wurden eine Reihe von glykolytischen Enzymen wie Glycerinaldehyd-Dehydrogenase, Enolase, Phosphoglyceratkinase, Phosphoglyceratmutase und Untereinheiten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes identifiziert. Auch wenn diesen Proteinen eine traditionelle Funktion im Zytoplasma zugeordnet wird und kein Translokationsmechanismus bekannt ist, ist eine Assoziation auf der Zelloberfläche und die Übernahme zusätzlicher Funktionen möglich (siehe Diskussion). Daher wurde ein Enzymtest etabliert (3.1.6), der eine Kontamination der Extrakte durch zytosolische Proteine von lysierten Zellen weitgehend ausschließen kann.

3.1.2. Kartierung des Subproteoms aller Zellwand-assoziierten Proteine

Die Komplexität der seriellen Extrakte war höher als erwartet und einige Proteinbanden konnten aus 1D-Gelen durch N-terminale Sequenzierung nicht eindeutig identifiziert werden. Für eine bessere Auftrennung und eine genauere Charakterisierung der Tris- und KSCN-Extrakte wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt, bei denen zuerst eine isoelektrische Fokussierung und dann eine SDS-Gelelektrophorese stattfand. Durch die hohe

Auflösung dieser Methode konnte die Komplexität der Subproteome bestimmt werden, so dass zwischen 120 und 180 Proteinspots mit dem RuBPS-Farbstoff detektierbar wurden. Für die Kartierung der gewählten Subproteome in der stationären Wachstumsphase einer Übernachtskultur von *L. monocytogenes* wurden insgesamt 34 und 67 der dominantesten Proteinspots ausgestochen.

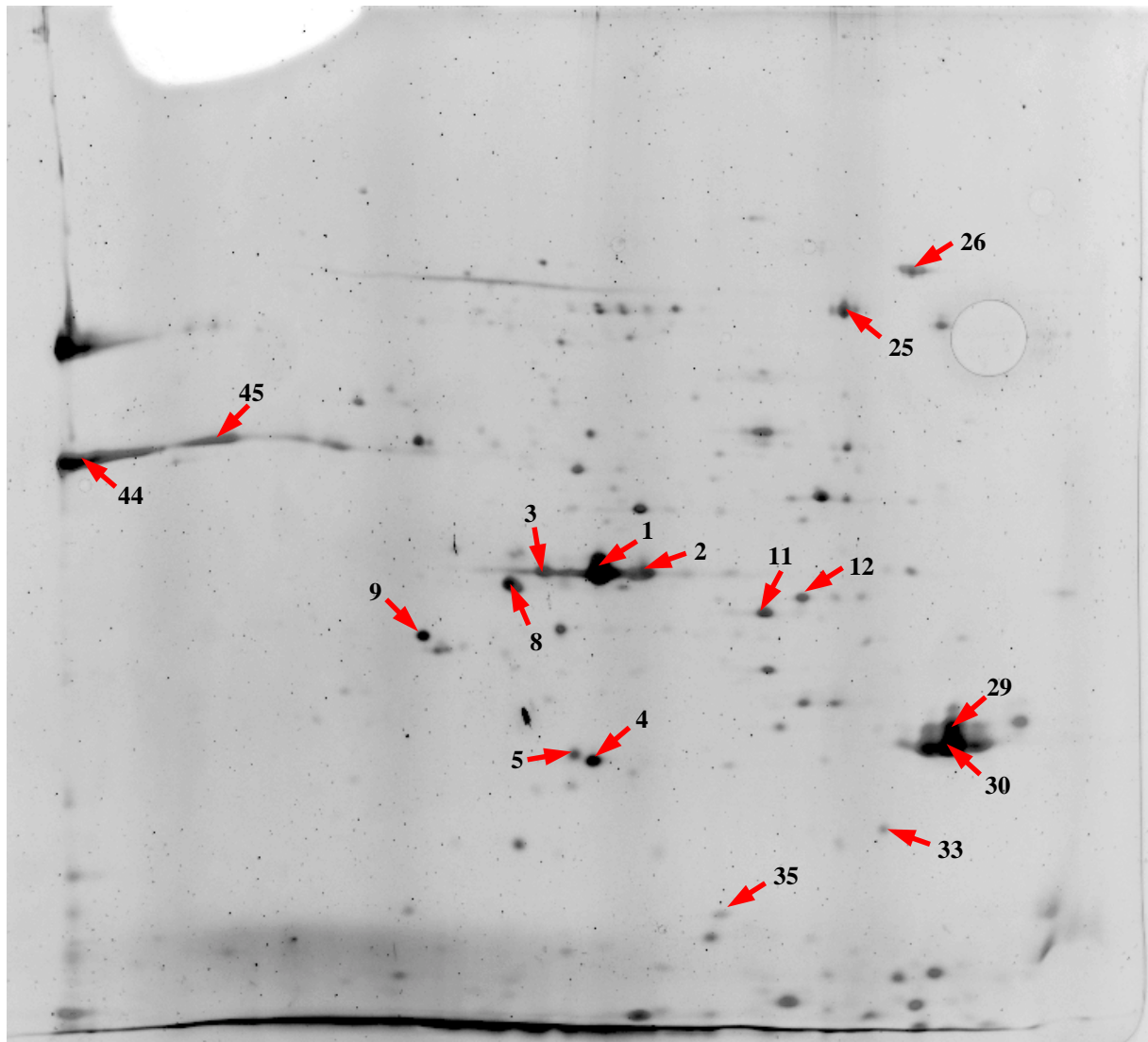


Abbildung 3.2 : Kartierung der Zellwand-assoziierten Proteine von *L. monocytogenes* nach Extraktion mit Tris. Aufgetrennt wurden die durch 1 M Tris pH 7.5 solubilisierbaren Oberflächenproteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese. Aus den RuBPS-gefärbten Gelen wurden die markierten Proteinspots ausgestochen und massenspektrometrisch identifiziert. Die identifizierten Spots und Proteine sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt.

Tabelle 3.2 Identifizierte Proteinspots aus 2D-Gelen der Zellwand-assoziierten Fraktion nach Tris-Extraktion. Die Identifikation erfolgte durch Peptidmassenfingeringdruck mittels MALDI oder Mikrosequenzierung im Q-TOFTM. Das Vorhandensein einer mit SignalP (www.expasy.ch) vorhersagbaren Signalsequenz ist in der Spalte SP angegeben. Eine Liste der funktionellen Kategorien (Kat) findet sich unter 4.1.

<i>Spot</i>	<i>Gen</i>	<i>Funktion</i>	<i>Kat</i>	<i>SP</i>
1-3	Lmo1847	Alp, Metallionen-Bindeprotein (ABC-Transporter)	1.1	Ja
3	Lmo0582	Iap, Invasion-assoziiertes Protein P60	1.2	Ja
4	Lmo1439	Superoxiddismutase	4.2	Nein
5	Lmo1314	Frr, Ribosomenrecyclingfaktor	3.7.5	Nein
8	Lmo0013	QoxA, Quinoloxidase Untereinheit II	1.4	Ja
9	Lmo0950	Unbekannt	5.2	Nein
10	Lmo1041	Molybdatbindeprotein (ABC-Transporter)	1.2	Ja
11	Lmo1738	Aminosäurebindeprotein ABP (ABC-Transporter)	1.2	Ja
12	Lmo0214	Mfd, Transkriptionsreparatur Couplingfaktor	3.2	Nein
25	Lmo2654	Fus, Elongationsfaktor G	3.7.4	Nein
26	Lmo1473	DnaK, Chaperonprotein	3.9	Nein
29, 30	Lmo0791	Unbekannt	5.2	Ja
33	Lmo0197	Sporulationsprotein G	1.7	Nein
35	Lmo2021	Unbekannt	5.2	Nein
44, 45	Lmo2505	Spl, Peptidoglycan-lytisches Protein P45	1.1	Ja

Mit Hilfe der Massenspektrometrie war eine Identifizierung von 19 Proteinspots der Tris-Fraktion und 45 der KSCN-Fraktion möglich. Das Identifizieren erfolgte über den Peptidmassenfingeringdruck mittels MALDI oder durch Mikrosequenzierung im Q-TOFTM. Die 2D-Karte der Zellwand-assoziierten Proteine, die durch Tris bzw. KSCN solubilisiert wurden, ist in Abbildung 3.2 bzw. 3.3 dargestellt.

Insgesamt konnten 59 verschiedene Proteine aus den Extrakten der Zellwand-assoziierten Proteine von *L. monocytogenes* identifiziert werden. Für 30 dieser Proteine ist eine Signalsequenz vorhergesagt. Dies steht im Einklang mit der Lokalisation außerhalb der Zelle und bestätigt die Effektivität der seriellen Extraktion zur Anreicherung jener Proteine. Unter diesen Proteinen befanden sich auch die bereits bekannten Oberflächenproteine wie das T-Zellen stimulierende Antigen (Tcsa), das Invasions assoziierte Protein (Iap) und das Peptidoglycan-lytische Protein (Spl). Außerdem konnten 11 weitere Lipoproteine (Lmo0285, Lmo1041, Lmo1073, Lmo1426, Lmo1671, Lmo1730, Lmo1738, Lmo1847, Lmo2219, Lmo2417, Lmo2636) gefunden werden, die nach Hinweisen aus Homologiesuchen wahrscheinlich den Substrat-binden Teil von Transporterkomplexen bilden. Ebenso wie in den eindimensionalen Gelen fanden sich auch hier bestimmte zytoplasmatische Proteine wie Enolase, DnaK und Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (Tabelle 3.2 und 3.3).

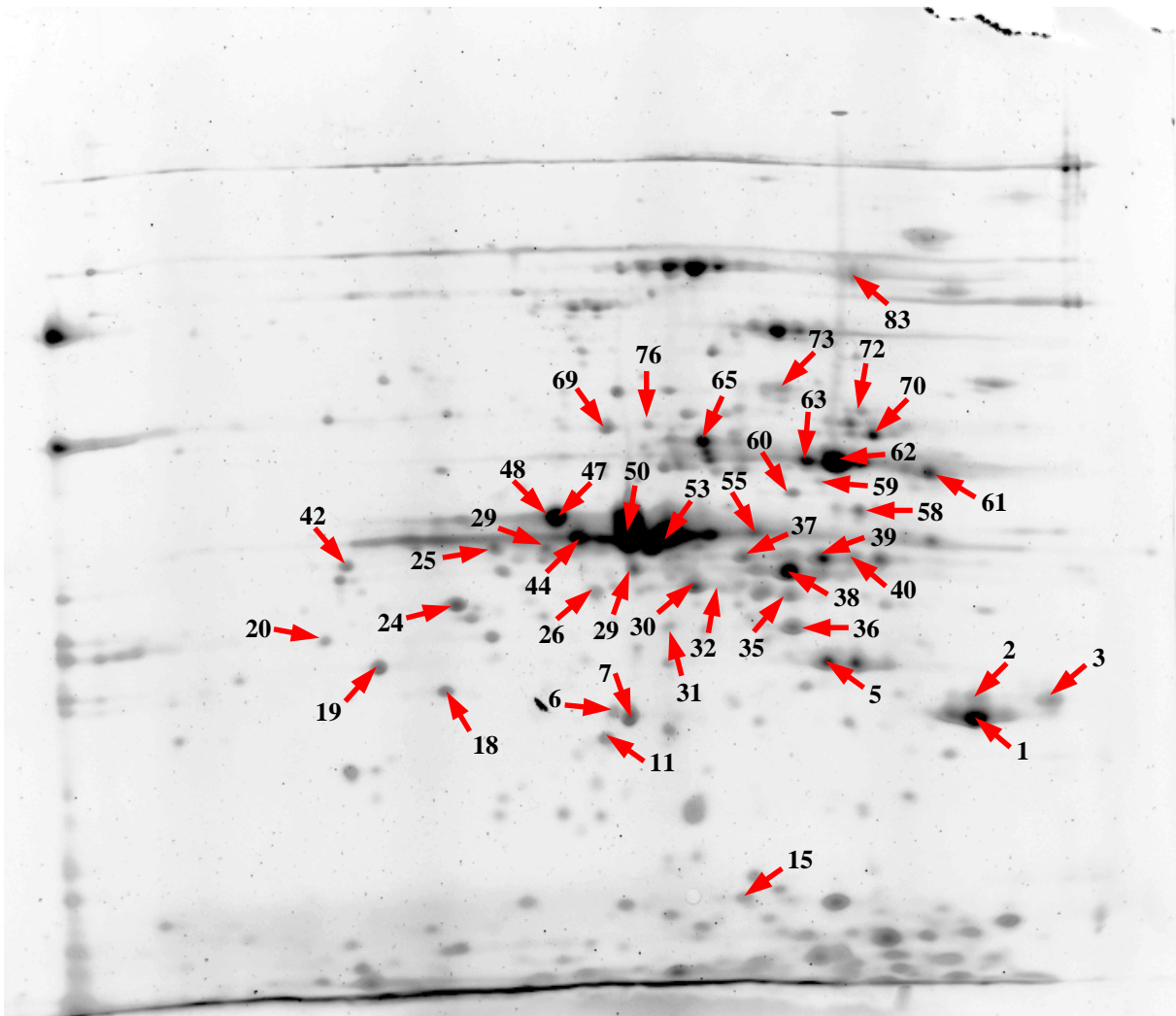


Abbildung 3.3: Kartierung der Zellwand-assoziierten Proteine von *L. monocytogenes* nach Extraktion mit KSCN. Aufgetrennt wurden die durch 1 M KSCN solubilisierbaren Oberflächenproteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese. Aus den RuBPS-gefärbten Gelen wurden die markierten Proteinspots ausgestochen und massenspektrometrisch identifiziert. Die identifizierten Spots und Proteine sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt.

Tabelle 3.3: Identifizierte Proteinspots aus 2D-Gelen der Zellwand-assoziierten Fraktion nach KSCN-Extraktion. Die Identifikation erfolgte durch Peptidmassenfingerprinting mittels MALDI oder Mikrosequenzierung im Q-TOF™. Das Vorhandensein einer mit SignalP (www.expasy.ch) vorhersagbaren Signalsequenz ist in der Spalte SP angegeben. Eine Liste der funktionellen Kategorien (Kat) findet sich in Tabelle 4.1.

<i>Spot</i>	<i>Gen</i>	<i>Funktion</i>	<i>Kat</i>	<i>SP</i>
1, 2	Lmo0791	Unbekannt	5.2	Ja
3	Lmo0047	Unbekannt	5.2	Ja
5	Lmo2331	Gp32, Bacteriophage A118 protein	4.4	Ja
7	Lmo1439	Sod, Superoxiddismutase	4.2	Nein
8	Lmo1314	Frr, Ribosomrecyclingfaktor	3.7.5	Nein
11	Lmo1059	Unbekannt	6	Ja
15	Lmo0739	6-Phosphobeta-glucosidase	2.1.1	Nein
18	Lmo1291	Acyltransferase	1.1	Nein
19	Lmo0443	LytR, Transkriptionsregulator	3.5.2	Ja
20	Lmo1967	Resistenzprotein für toxische Ionen	4.2	Nein
24	Lmo0950	Unbekannt	5.2	Ja
25	Lmo1068	Unbekannt	6	SP
27	Lmo0223	CysK, Cysteinsynthase	2.2	Nein
28	Lmo2556	FbaA, Fructose 1,6-bisphosphataldolase	2.1.1	Nein
29	Lmo2219	Proteinexport Protein PrsA	1.6	Ja
30	Lmo2417	Lipo/Bindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja
32	Lmo1426	OpuCC, Osmoprotectant-Bindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja
35	Lmo1738	Aminosäurebindeprotein ABP (ABC Transporter)	1.2	Ja
36	Lmo1041	Molybdatbindeprotein (ABC-Transporter)	1.2	Ja
37	Lmo1073	Metallionenbindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja
38	Lmo1738	Aminosäurebindeprotein ABP (ABC Transporter)	1.2	Ja
39	Lmo0285	Lipoprotein, Transport/Bindeprotein	1.2	Ja
40	Lmo0285	Lipoprotein	1.2	Ja
42	Lmo2415	ATP-Bindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Nein
44, 50, 53	Lmo1847	Alp, Metallionenbindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja
47	Lmo1068	Unbekannt	6	SP
48	Lmo1068	Unbekannt	6	SP
49	Lmo1068	Unbekannt	6	SP
53	Lmo2637	Lipoprotein	1.8	Ja
55	Lmo2637	Lipoprotein	1.8	Ja
58	Lmo1757	Unbekannt	5.2	Ja
59	Lmo1053	PdhB, Pyruvatdehydrogenase	2.1.2	Nein
60	Lmo1757	Unbekannt	5.2	Ja
61	Lmo0292	Hitzeschockprotein HtrA, Serinprotease	4.1	Nein
62	Lmo1388	TcsA, T-Zell-stimulierendes Antigen	1.2	Ja
63	Lmo1671	Adhäsions/Lipoprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja
65	Lmo2636	Lipoprotein	5.2	Ja
69	Lmo2459	Gap, Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase	2.1.2	Nein
70	Lmo1730	Zuckerbindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja
72	Lmo2455	Eno, Enolase	2.1.2	Nein
73	Lmo2653	TufA, Translation Elongationsfaktor	3.7.4	Nein
83	Lmo2068	GroEL, Chaperonin	3.9	Nein

3.1.3. Isolierung von Zellwandproteinen durch endolytische Protoplastierung

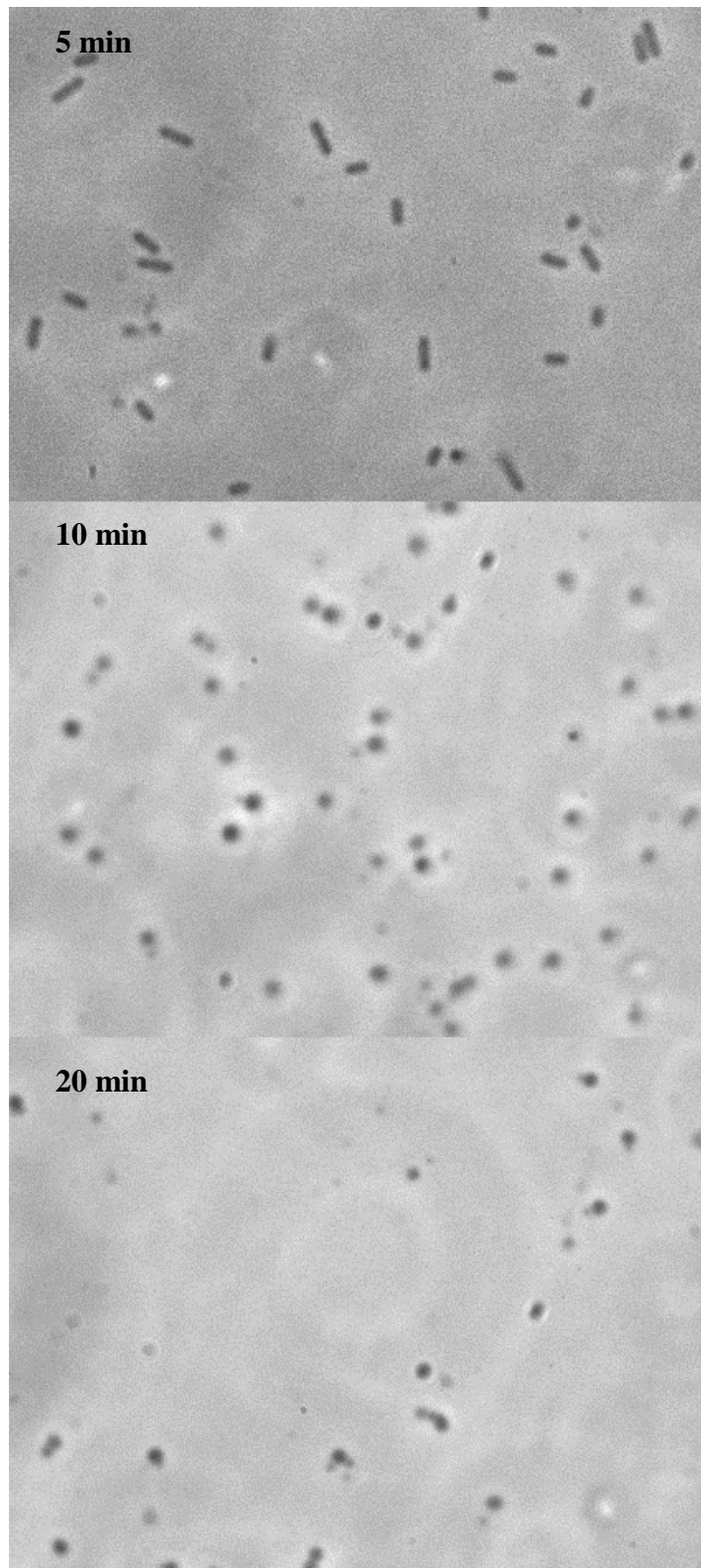


Abbildung 3.4:
Mikroskopische Aufnahmen
(Phasenkontrast) der
Protoplastierung von *L.*
monocytogenes durch das
Phagenlysin 511 nach 5, 10
und 20 Minuten.

Mit der seriellen Extraktion wurden in erster Linie Zellwand-assoziierte Proteine solubilisiert, die nicht-kovalent an die Zelloberfläche gebunden waren. Um eine möglichst vollständige Fraktion aller Proteine der Zellwand von *L. monocytogenes* zu erhalten, wurde ein Verfahren zur endolytischen Protoplastierung etabliert. Die Methode der Protoplastierung wurde anfangs mit einem Enzymcocktail aus Mutanolysin, Lysozym und Ampicillin durchgeführt. Da dieses Verfahren aber sehr lange (1,25 Stunden) dauerte und die Zellen dabei vermutlich stark beschädigt oder verändert wurden, wurde die Protoplastierung mit dem Phagenlysin 511 durchgeführt. Das Phagenendolysin 511 stammt aus dem Bakteriophagen A511, der eine vollständige Zelllyse verursacht. Das Phagenendolysin alleine, welches durch Klonierung in *E.coli* überexprimiert und aufgereinigt wurde (Loessner *et al.*, 1996, 2002), kann jedoch keine vollständige Zelllyse herbeiführen. Es stellt eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase dar. Um die Wirkung des Phagenlysins zu unterstützen wurde Mutanolysin zugefügt. Mutanolysin spaltet zusätzlich die β 1-4 N-Acetylmuramyl-1-N-Acetylglucosamin-Bindung im Peptidoglycangerüst und zerstört größere Zellwandfragmente.

Die tatsächliche Wirkung und optimale Dauer der Phagenlysinbehandlung während der Protoplastierung wurde in Aliquots unter dem Mikroskop im Phasenkontrast untersucht (Abbildung 3.4). Die optimale Inkubationsdauer der Listerien mit PLY511 wurde mit 10 Minuten ermittelt. Nach 5 Minuten Inkubation lagen die Listerienzellen als unveränderte Stäbchen vor. Nach 10 Minuten waren keine Stäbchen mehr zu erkennen, sondern kugelfunde Protoplasten, deren Form sich durch die fehlende Zellwand ergab. Wurden die Listerien 20 Minuten mit Phagenlysin inkubiert, waren deutlich weniger Zellen insgesamt und einige Zelltrümmer zu sehen, so dass bei dieser Zeitdauer schon die Zelllyse einzusetzen schien.

3.1.4. Kartierung des Subproteoms der Zellwandproteine

Für eine Charakterisierung der Zellwandfraktion von *L. monocytogenes* wurde das Peptidoglycangerüst der Zellwand mit Hilfe des Phagenendolysins PLY511 verdaut und somit die Zellwandproteine freigesetzt. Diese wurden durch vorsichtiges Abtrennen der Protoplasten isoliert und zweidimensional im Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abbildung 3.5). Die Identifizierung des RuBPS gefärbten Proteinmusters erfolgte durch MALDI-MS und ESI-Q-TOF. Insgesamt konnten 23 verschiedene Proteine aus der Protoplastierungs-Zellwandfraktion identifiziert werden (Tabelle 3.4). Darunter befanden sich 11 Proteine, die ebenfalls in den seriellen Extrakten durch Tris- und KSCN-Inkubation (siehe 3.1.3)

identifiziert wurden: die Chaperone Dnak und GroEL, die glykolytischen Enzyme Enolase und Fructose-1, 6-Bisphosphataldolase, der Elongationsfaktor G, die Cysteinsynthase, Superoxiddismutase, Pyruvatdehydrogenase, Dihydroxynaphtonsäuresynthase und das Lipoprotein Lmo1847. Unter den abweichend gefundenen Proteinen konnte nur für Lmo0791 mit unbekannter Funktion, für Lmo1083, eine DTDP-D-Glucose 4, 6-Dehydrase, und für Lmo1082, eine DTDP-Zuckerepimerase, eine Signalsequenz vorhergesagt werden. Damit wurde insgesamt nur für vier Proteine in den endolytischen Zellwandfraktionen eine Lokalisation außerhalb des Zytoplasmas bestätigt. Mit der Methode der seriellen Extraktion konnten dagegen 30 Protein mit wahrscheinlicher und teilweise bestätigter Signalsequenz identifiziert werden. Daher ist diese Methode effizienter um Zellwand-assoziierte Proteine anzureichern, im Gegensatz zu der nachfolgend etablierten endolytischen Protoplastierung. Aufgrund der hohen Präsenz an typischen zytoplasmatischen Proteinen in den Subproteomen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Test entwickelt, der die Qualität bzw. eine Konatmination durch lysierte Zellen feststellen sollte (siehe 3.1.6).

Tabelle 3.4: Identifizierte Proteinspots aus 2D-Gelen der Zellwandfraktion nach endolytischer Protoplastierung. Die Identifikation erfolgte durch MALDI oder QTOF. Das Vorhandensein einer mit SignalP (www.expasy.ch) vorhersagbaren Signalsequenz ist in der Spalte SP angegeben

<i>Spot</i>	<i>Gen</i>	<i>Funktion</i>	<i>Kat.</i>	<i>SP</i>
2	Lmo2069	GroES, Chaperonin	3.9	Nein
3	Lmo0904	unbekannt	6	Nein
6	Lmo1445	ZurR Transkriptionsregulator	3.5.2	Nein
7	Lmo1583	Thiolperoxidase	4.2	Nein
8	Lmo1439	Sod, Superoxiddismutase	4.2	Nein
9	Lmo0791	Unbekannt	5.2	Ja
12	Lmo1673	MenB, Dihydroxynaphtonsäuresynthase	2.5	Nein
13	Lmo1011	Tetrahydrodipicolinatsuccinylase	2.2	Nein
14	Lmo2556	Fructose-1, 6-Bisphosphataldolase	2.1.1	Nein
15	Lmo2415	ATP-Bindeprotein (ABC-Transporter)	1.2	Nein
17	Lmo0223	CysK, Cysteinsynthase	2.2	Nein
18	Lmo1847	Alp, MetallionenBindeprotein (ABCTransporter)	1.2	Ja
20	Lmo2101	Enzym der Pyridoxinsynthase	2.5	Nein
21	Lmo0210	Ldh, L-Lactatdehydrogenase	2.1.1	Nein
23	Lmo1083	DTDP-D-Glucose 4, 6-Dehydrase	1.1	Ja
25	Lmo0978	Aminosäure Aminotransferase	2.2	Nein
29	Lmo1053	PdhB, Pyruvatdehydrogenase	2.1.2	Nein

30	Lmo2455	Eno, Enolase	2.1.2	Nein
31	Lmo1082	DTDP-Zuckerepimerase	1.1	Ja
32	Lmo1086	CDP-Ribitolpyrophosphorylase	2.1	Nein
33	Lmo0913	Succinatsemialdehyddehydrogenase	2.1.1	Nein
34	Lmo1473	DnaK, Chaperonprotein	3.9	Nein
35	Lmo2654	Fus, Elongationsfaktor G	3.7.4	Nein
36	Lmo2068	GroEL, Chaperonin	3.9	Nein

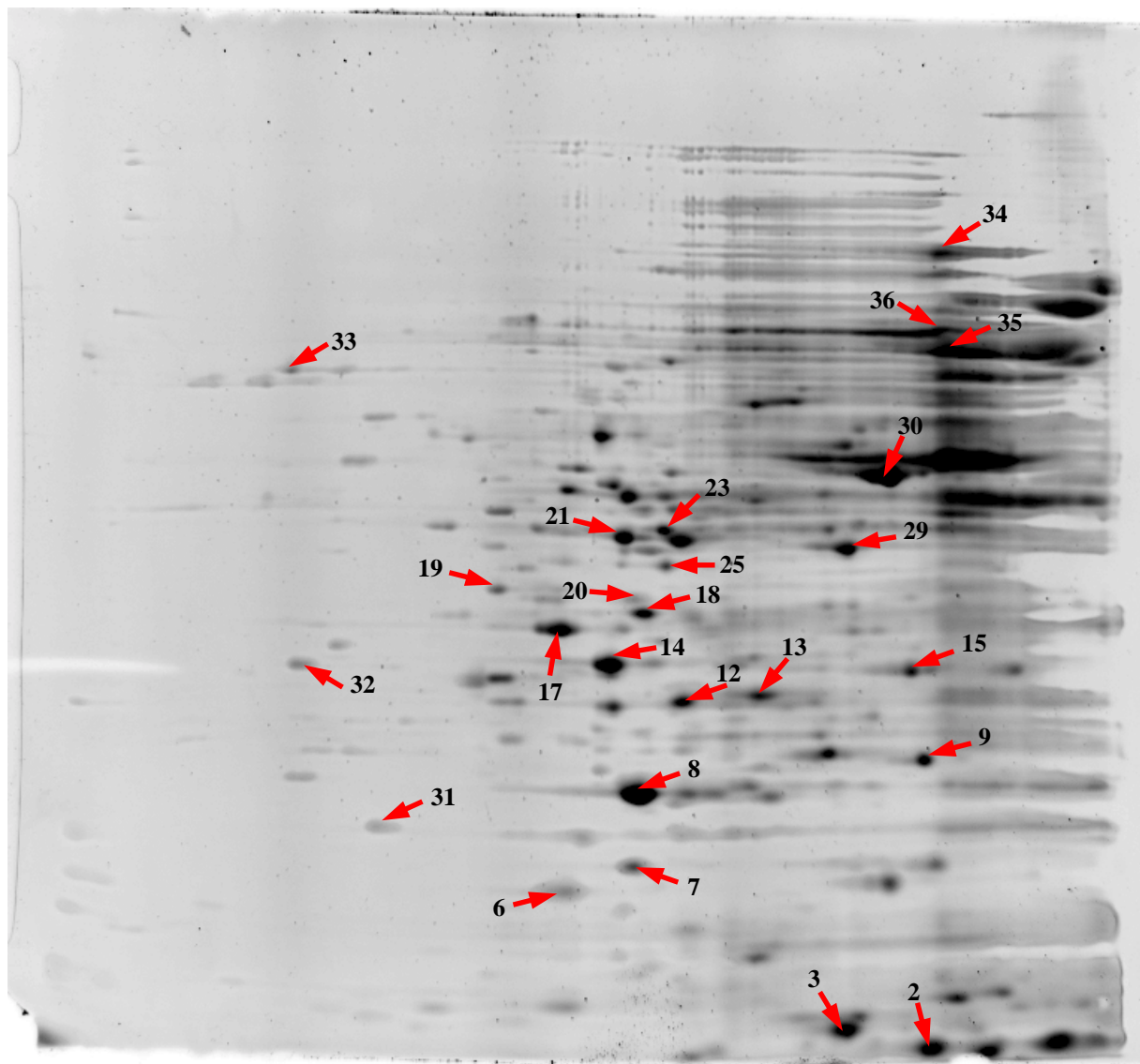


Abbildung 3.5: Kartierung des Zellwand-Subproteoms von *L. monocytogenes*. Aufgetrennt wurde die durch endolytische Protoplastierung mit PLY511 erhaltene Proteinfraction mittels zweidimensionale Gelelektrophorese. Aus den RuBPS-gefärbten Gelen wurden die markierten Proteinspots ausgestochen und massenspektrometrisch identifiziert. Die identifizierten Spots und Proteine sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt.

3.1.5. Etablierung des AminopeptidaseC-Tests zum Ausschluss einer zytoplasmatischen Verunreinigung der Oberflächenproteinextrakte

Zur Überprüfung der Qualität der Zellwandproteinextrakte wurde dieser Enzymtest entwickelt. In den Extrakten Zellwand-assoziiierter Proteine sowie der endolytischen Zellwandfraktion von *L. monocytogenes* wurden zahlreiche typische zytoplasmatische Proteine identifiziert. Das Ziel des Tests war auszuschließen, dass die Proteine durch starke Zelllyse während der seriellen Extraktion oder Protoplastierung freigesetzt werden und somit die Fraktionen verunreinigen. Hierbei sollte die Aktivität eines zytoplasmatischen Enzyms nachgewiesen werden bzw. –zum Ausschluss starker Lyse bei den isolierten Zellwandsubproteomen- nicht nachweisbar sein.

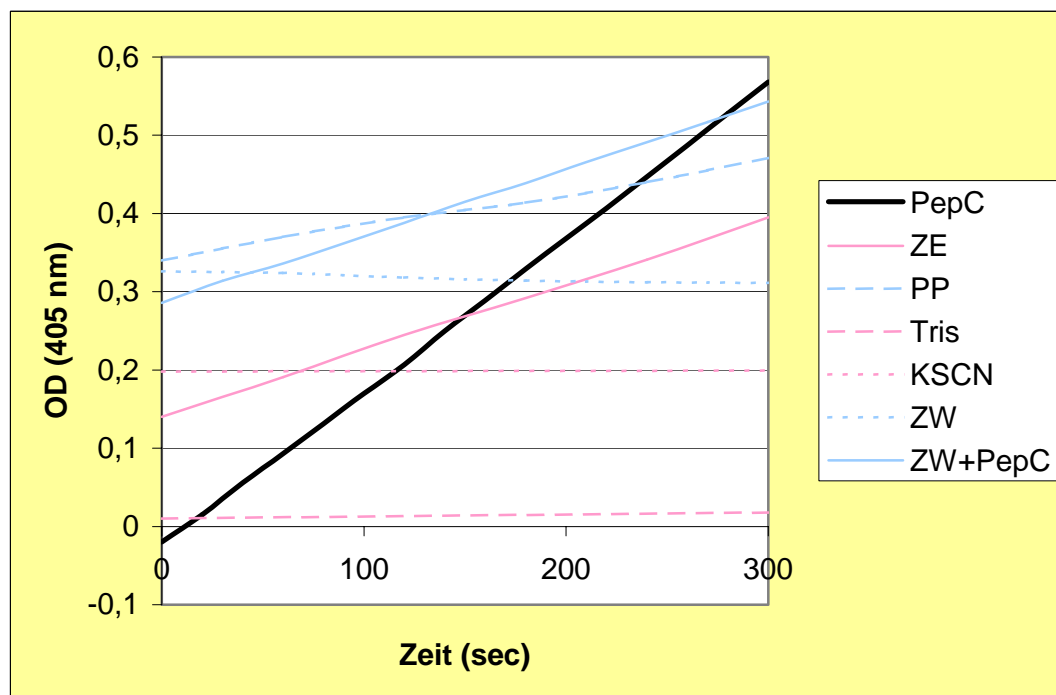


Abbildung 3.6: Enzymatische Umsetzung von Arginin-p-Nitroaniliden durch Aminopeptidase C in verschiedenen Extrakten von *L. monocytogenes*. PepC: Positivkontrolle durch Aminopeptidase von *Aeromonas proteolytica*, ZE: Gesamtzellextrakt, PP: Protoplastenextrakt, Tris: Oberflächenproteinextrakt durch Tris, KSCN: Oberflächeproteinextrakt durch KSCN, ZW: Zellwandextrakt durch Protoplastierung

Die Aminopeptidase C (PepC) wird durch den Genlocus *lmo2338* im Genom von *L. monocytogenes* kodiert. Die Funktion dieses Enzyms ist eine allgemeine Aminopeptidase-aktivität und zusätzlich wird die Inaktivierung von Bleomycin B2, einem cytotoxischem Glycometallpeptid vermutet (Winters *et al.* 2000). Da Listerien nicht in der Lage sind, alle Aminosäuren selbst zu synthetisieren, hydrolysieren sie mit Hilfe der Aminopeptidasen aufgenommene Peptide, um verwertbare Aminosäuren zu erhalten. Die Aminopeptidase C ist intrazellulär lokalisiert und nicht streng substratspezifisch.

Die höchste Aktivität konnte bei p-Nitroanilidderivaten von Arginin, Glutamin und Lysin nachgewiesen werden (Winters *et al.* 2000). Der Abbau der p-Nitroanilidderivate konnte hierbei photometrisch gemessen werden. Als Positivkontrolle wurde eine aufgereinigte Aminopeptidase von *Aeromonas proteolytica* verwendet. In Gesamtzell- und Protoplastenextrakten von *L. monocytogenes* konnte ebenfalls als Positivkontrolle durch Absorptionsmessung die Aktivität einer zytoplasmatischen Aminopeptidase nachgewiesen werden. Eine Aminopeptidase-Aktivität konnte in allen Oberflächenproteinextrakten von *L. monocytogenes* nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Kontamination der Subproteome durch zytoplasmatische Proteine, wie PepC, durch Zelllyse (Abbildung 3.6) konnte daher weitestgehend ausgeschlossen werden.

In dem apathogenen Stamm *L. innocua* fand sich homologer Genabschnitt *lin2838* zu *lmo2691*. Der tierpathogene Stamm *L. ivanovii* besaß ebenfalls einen sehr ähnlichen offenen Leserahmen. Da P70 stark mit Internalin B assoziiert nachgewiesen werden konnte, wurde nach Hinweisen auf eine Funktion in der Pathogenität und eine PrfA-Regulation gesucht. In der DNA-Sequenz strangaufwärts des Genlocus *lmo2691* von P70 konnte aber kein PrfA-Promotor-Konsensus gefunden werden.

3.2.2. Untersuchung der Aminosäuresequenz von P70

Die vollständige Sequenz des N-terminal ansequenzierten Proteins P70 von 590 Aminosäuren konnte mit Hilfe der Genomsequenz bestimmt werden. Das theoretische Molekulargewicht lag bei 63,572 kD und der isoelektrische Punkt bei 9.73 (Compute pI/MW). Mit SignalP wurde eine Signalpeptidsequenz von Aminosäure 1-52 vorhergesagt. Die Spaltungstelle für die Signalpeptidase II stimmte mit der ansequenzierten Position des prozessierten Proteins überein. Auffällig an der Sequenz von P70 war außerdem eine Homologie zu dem Invasions-assoziierten Protein P60 (IAP) von *L. monocytogenes*. Das Protein IAP ist PrfA-reguliert und spielt eine noch unbekannte Rolle bei der Virulenz.

P70 *L. monocytogenes*



Muramidase-2 *E. hirae*



Autolysin *E. faecalis*



IAP *L. monocytogenes*



Abbildung 3.8: Aufbau des Proteins P70 und verwandter Proteine. SP = Signalpeptid, Amidase_4 = Domäne peptidoglycanlysierender Proteine (Pfam), LysM = Domäne Zellwand-degradierender Enzyme (Pfam), SH3b = SH3b-Domäne (Pfam), NLPC_P60 = Domäne mit unbekannter Funktion

Die Untersuchung der Aminosäurenabfolge von P70 zeigte eine interne Wiederholungssequenz. Ein Abschnitt von 44 Aminosäuren tritt hochkonserviert viermal innerhalb des Proteins auf. Diese Wiederholungen waren auch in dem Protein IAP zu finden und stellten die Grundlage der Homologie zwischen den beiden Proteinen dar.

Die Wiederholungssequenzen waren bekannte Proteindomänen (LysM) von Enzymen, die in den Zellwandabbau involviert sind. Ein weiteres Segment bei P70 war eine Amidase_4-Domäne, die für Peptidoglycan-lysiierende Proteine charakteristisch ist (Abbildung 3.8). Diese mögliche Funktion wurde auch durch eine Homologiesuche in Proteindatenbanken bestätigt. Das Protein P70 zeigte eine Homologie zur Muramidase 2 von *Enterococcus hirae* (Swissprot P39046) und Autolysin von *Enterococcus faecalis* (Swissprot P37710), die beide Peptidoglycanhydrolasen sind (Abbildung 3.8 und 3.9).

BAD AVG GOOD

Lmo2691	(P70)	-MQKTRKERILEALQEEKKNKSKKFKTGATIAGVTAIATSITVPGIEVIVSAD
Lin2823		-MQKTRKERILEALKEEKNKSNKFKTGATIAGVTAIATSITVPGIEVMVSAD
Muramidase2		MENIARKER-----RRLNETKRFRKVKRSAAALVGTAMVGCSSAAPLIQ-----
Autolysin		-MKKESMSRT-ERRKAQQRKKTPVQWKSTTLFSSALIVSSVGTTPVALLPVTAEE
Lmo0582	(IAP)	-----MNMKKATIAATAGIAVTA-----
Lmo2691	(P70)	ETAPADEASKSAEANTTK-----EASA---TATPENTAKQTVG
Lin2823		ETAPADESSKTANPTAST-----ETNTNTETATPDKTVENKTE
Muramidase2		-----
Autolysin		ATEEQPTNAEVAQAPTTEGLVETPTTETTPGITTEQPTDSSTTTESTESSKE
Lmo0582	(IAP)	-----
Lmo2691	(P70)	PQQTETKEQ---TKTPEEKQAATNQV-EKAPAEPATVSN-----PDNATSS
Lin2823		TKQTETKEQ---ATTPTEKAPVAKQV-EKTPAEPITVSN-----PDDKTSS
Muramidase2		-----
Autolysin		TPPTPSTEQPTVDSTTPVESGTTDSSVAEITPVAPSTTESAAPAVTPDDEVKV
Lmo0582	(IAP)	-----
Lmo2691	(P70)	STPATYNLLQKSALRSGATVQSFIQTIQASSSQIAAENDLYASVMIAQAILESA
Lin2823		PTPATYNLVQKTALRSGATIQSFINIQASSSQIAAANDLYASVMIAQAILESA
Muramidase2		-PVQVDADQTPTFGARINTAAFIATYATYQPIAQANDLYASVMIAQAVVESG
Autolysin		PEARVASAQTFALSPTQSPSEFIAELARCAQPIAQANDLYASVMMAQAIVESG
Lmo0582	(IAP)	-----
Lmo2691	(P70)	YGTSELGSAPNYNLFGIKGAYNGQSYTKQTLEDDGKNYYTITAKFRKYPSPYHQ
Lin2823		YGTSELGSAPNYNLFGIKGAYNGQSYTKQTLEDDGKNYYTITAKFRKYPSPYHQ
Muramidase2		WGSSALSQAPYYNLFGIKGSYQGQTVYMDTLE-YNLNKWSKKEPFRQYPSFAE
Autolysin		WGASTLSKAPNYNLFGIKGSYNGQSVYMDTWE-YNLNGKWLKKEPFRKYPSPYME
Lmo0582	(IAP)	-----
Lmo2691	(P70)	SLEDYAQVIRKGPSWNE-NYYSKAWKSNTTSYKDATKALTGTATDTAYATKLN
Lin2823		SLEDYAKVIRNGPSWNS-NYYSKVWKSNTNSYKDATKALTGTATDTAYATKLN
Muramidase2		SFNDNAYVLRNTSFGNG-YYYAGTWKSNKSYTDATACTLGRYATDPGYAGKLN
Autolysin		SFQDNHVLKTTSFQAGVYYYAGAWKSNTSSYRDATAWLTGRYATDPGYAKLN
Lmo0582	(IAP)	-----
Lmo2691	(P70)	DLISRYNLTQYDS-----GKTTGGNSGSTGNSSNTG-----NTSNA-K
Lin2823		DLISRYNLTQYDS-----GKTTGGNSGNTGNTGNTG-----NTGNTNTSNA-K
Muramidase2		NIITTYGLTKYDTPASGNAGGGVTIGNGGNTGNTSNGSTSGNSGGSATTGT-T
Autolysin		NVITAYNLTQYDT-----PSSGGNTGGGTVPNGTGG-----SNNQSGTNT
Lmo0582	(IAP)	-----FAAP-TIASA-S
Lmo2691	(P70)	IYTVVKGDSLWRIANNHKVTVANLKAOWNLKSDFIYPGQKLV-SAGST---TS

Lin2823			IYTVVKGDSLWRIANNHKVTIANLKSWNNLKSDFIYPGQKLKVSAGTT----TS
Muramidase2			YTYVKS GDSVWGISHSFGITMAQLIEWNNIKNNFIYPGQKLTIKGGQSAGSSTT
Autolysin			YTYVKS GDTLNLKIAAQYGVSVANLRSWNGISGDLIFVGQKLIVKKGAS----GN
Lmo0582	(IAP)		TVVVEAGDTLWGIAQSKGTTVDAIKKANNLTDDKIVPGQKLQVNNNEVA AAEKTE
Lmo2691		(P70)	DT----NTSKPST-GTSTSKPSTGTSTNAKVYTVVKGDSL-W-RIANNHKVT--
Lin2823			NT----NTSKPST-NTNTSKPS--TSTNAKVYTVAKGDSL-W-RIATNHKVT--
Muramidase2			NTGNNASSGNTSG-NTNTSGSTG--QATGAKYTVKSGDSV-W-KIANDHGIS--
Autolysin			TG----GSGNGGS-NNNQSG-----TNTYYTVKSGDTL-N-KIAAQYGVV-
Lmo0582	(IAP)		KSVSATWLNVRSGAGVDNSII--TSIKGGTKVTVETTESNGWHKITVNDGKTGF
Lmo2691		(P70)	IANLKAWNNLKSDFIYPGQKLKVSAGSTS-N-TNTS-----KPSTN
Lin2823			IANLKSWNNLKSDFIYPGQKLKVSAGTTTSN-TNTS-----KPSTN
Muramidase2			MNQLIEWNNIKNNFVYPGQQLVVS KGSSSAS-GSTSN-----STGNTS
Autolysin			VANLRSWNGISGDLIFVGQKLIVKKGTSGNT-GGS-----SNGGSN
Lmo0582	(IAP)		VNGKYLTDKAVSTPVAPTQEVKKETTQQAAPAAETKTEVKQTTQATT PAPKVA
Lmo2691		(P70)	TNTSKPSTNTNTNAKVYTVAKGDSLWRIANNHKVTIANLKAWNNLKSDFIYPGQ
Lin2823			TNTSKPS--TSTNAKVYTVAKGDSLWRIATNHKVTIANLKSWNNLKSDFIYPGQ
Muramidase2			SNTANTGST--TSGSTYTVKAGESVWSVSNKFGISMNQLIQWNNIKNNFIYPGQ
Autolysin			NNQSGT-----NTYYTIKSGDTLNLKIAAQYGVSVANLRSWNGISGDLIFAGQ
Lmo0582	(IAP)		ETKETPVVD--QNATTHAVKSGDTI WALSVKYGVSVQDIMSWNNLSSSIYVQG
Lmo2691		(P70)	KLKVSAGSTTN-TNTA-----
Lin2823			KLKVSAGTTTTNTNAA-----
Muramidase2			KLIVKGGSSSSNASTSTANNKNTASSNTSSTATGQATYTVKAGESVWGVANKNG
Autolysin			KLIIVKKGTSGNTGGSSNGGSNN---NQSGTNT--YTTIKSGDTLNLKISAQFG
Lmo0582	(IAP)		KLAIKQTANTAT- PKAEVKT--EAPAAEKQA--APVVKENTNTNTATTEKK
Lmo2691		(P70)	-----KPS
Lin2823			-----KPS
Muramidase2			ISMNQLIEWNNIKNNFIYPGQKLIVKGGSSKASA-----TATIKPT
Autolysin			VSVANLRSWNGIKGDLIFAGQTIIVKKGAS-----
Lmo0582	(IAP)		ETATQQQTAPKAPTEAAKPAP---APSTNTNANKTNTNTNTNTNTNTNTNTPS
Lmo2691		(P70)	TNN-----
Lin2823			TNK-----
Muramidase2			AST-----PAS
Autolysin			AGG-----NAS
Lmo0582	(IAP)		KNTNTNSNTNTNTNSNTNANQGSNNNSNSSSASAIIEAQKHLGKAYSWGGNGP
Lmo2691		(P70)	-----
Lin2823			TTPTASSTGDTKYTVKAGESVWGVANKHHITMDQLIEWNNIKNNFIYPGQEVIV
Muramidase2			STNS-----
Autolysin			TTFDCSGY-TKYVFAKAGISLPRTSGAQYASTTRISESQAKPGDLVFDYGSGL
Lmo0582	(IAP)		-----
Lmo2691		(P70)	-----PSNSTVKTYTVKKGDSLWAI SRQYKTTVDNIKAWNKLTSNMHVGO
Lin2823			-----PSNSAVKTYTVKKGDSLWAI SRQYKTTVDNIKAWNKLTSNMHVGO
Muramidase2			KKGTAQSTPAKSDEKTYTVKAGESVWGVADSHGITMNLIEWNNIKNNFIYPGQ
Autolysin			-----ASGKRHTVKS GDSLWGLSMQYGISIQKIKQLNGLSGDTIYIGQ
Lmo0582	(IAP)		S-----HVGIIYVGNQMINAQDNGVKYDNIHG-SGWGKYLVGFR
Lmo2691		(P70)	KLTIK-
Lin2823			KLTIK-
Muramidase2			QLIVKK
Autolysin			TLKVG-
Lmo0582	(IAP)		V-----

Abbildung 3.9: Sequenzvergleich des Proteins P70 von *L. monocytogenes* mit den dem orthologen Genprodukt aus *L. innocua* und den homologen Proteinen Muramidase-2 aus *Enterococcus hirae*, Autolysin aus *Enterococcus faecalis* und IAP aus *L. monocytogenes*.

3.2.3. Herstellung von Antikörpern gegen P70

Zur weiterführenden Analyse und Detektion der N-Acetylmuramidase P70 durch monoklonale Antikörper wurden die Peptide P70a und P70b (siehe 2.11.1) aus der P70-Sequenz synthetisiert. Zur Herstellung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen P70 wurden Mäuse mit den an Ovalbumin gekoppelten Peptiden immunisiert. Die Antikörper produzierenden Lymphocyten der Maus wurden isoliert und mit einer Myelomzelllinie fusioniert. Die Kulturüberstände dieser Fusionszelllinie, die permanent spezifische Antikörper sekretieren, wurden im ELISA auf ihre Erkennungsreaktion mit den Peptiden getestet. Die Überstände der Zellen, die am stärksten reagiert hatten, wurden anschließend im Westernblot mit aufgetrennten Tris-Extrakten von *L. monocytogenes* inkubiert. 20 Überstände, die sowohl spezifisch das Peptid P70a oder P70b als auch das denaturierte Protein P70 in Tris-Extrakten erkannten, wurden einem Subklassentest unterzogen (siehe Abbildung 3.10).

Klon	ELISA auf P70a	ELISA auf P70b	Westernblot Tris-Extrakt	Subklasse
2	-	++	+	IgG ₁ , M
11	-	++	+	IgG ₁ , M
15	+	+	(+)	IgG _{1, 2a}
35	-	+	+ weitere Banden	IgG _{1, 2a} , M
53	-	+	-	-
61	-	+	+ weitere Banden	IgG _{1, 2a} , M
73	-	+	(+)	IgG ₁
123	-	+	+	IgG _{1, 2a} , M
128	-	++	+	IgG ₁
131	(+)	+	+	IgG ₁ , M
148	(+)	++	-	IgG _{1, 2a} , M
193	-	++	+	IgG _{1, 2a, 3}
204	+	+	Schmier InIB	IgG _{1, 2a} , M
222	-	++	++	IgG _{1, 2a} , M
228	-	++	+	IgG _{1, 2a}
239	-	++	++	IgG _{1, 3} , M
248	(+)	-	+	IgG ₁
256	-	+	++	IgG ₁
265	+	(+)	++	IgG _{1, 2a} , M
322	-	+	+	IgG _{1, 2a}
324	-	++	++	IgG _{1, 2a} , M
133	-	-	-	IgG ₁ , M

Abbildung 3.10: Übersicht und Charakterisierung ausgewählter Klone der Fusion zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen P70. Getestet wurde im ELISA auf die Peptide, die zur Immunisierung verwendet worden waren und im Westernblot mit Tris-Extrakten von *L. monocytogenes*.

Aus dieser Gruppe wurden zur Subklonierung die Zellpopulationen 2, 11, 228 und 239 ausgesucht, die alle gegen das Peptid P70b, nicht gegen das Peptid P70a und deutlich im Blot reagierten. Die vereinzelt Antikörper-produzierenden Klone wurden erneut im ELISA und Westernblot getestet (Abbildung 3.11). Viele Einzelklone zeigten wie vorher auch die Mischklone zusätzliche Reaktionen mit anderen Proteinbanden im geblotteten Tris-Extrakt. Die stärkste Bande dieser Nebenreaktion wurde als invasions-assoziiertes Protein IAP von *L. monocytogenes* identifiziert. Die Proteine P70 und IAP besitzen wie oben erwähnt (3.2.2) stark homologe Abschnitte in ihrer Aminosäuresequenz, die eine Kreuzreaktion der Antikörper erklären.

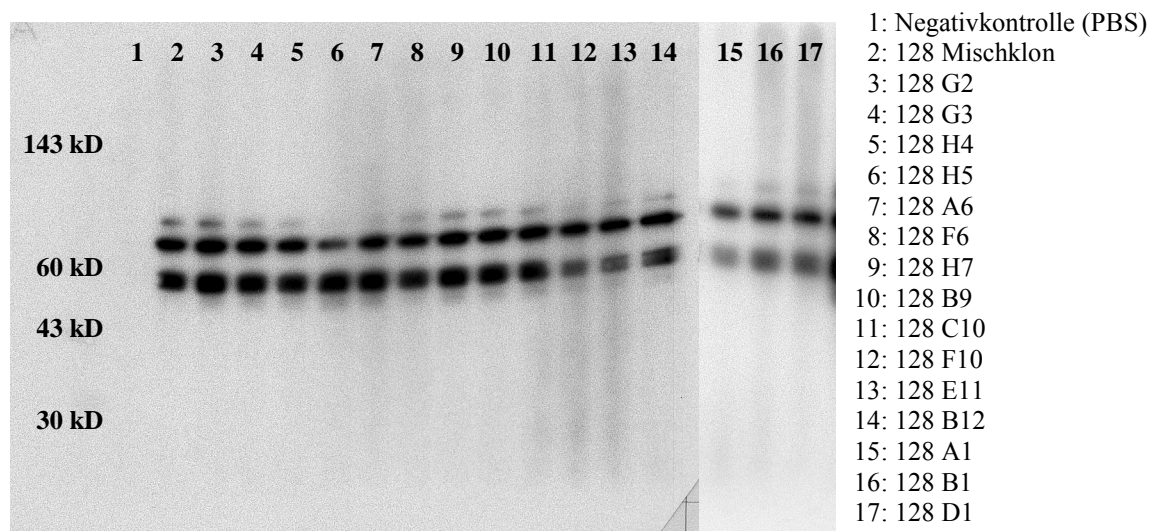


Abbildung 3.11: Test der monoklonalen Antikörper gegen Protein P70 von *L. monocytogenes*. Die Kulturüberstände verschiedener Einzelklone der Antikörper produzierenden Fusionszelllinie 128 wurden auf ihre Bindungseigenschaften in einer Slotblotkammer getestet. Auf die PVDF-Membran war zuvor ein im 10 % igen SDS-Gel aufgetrennter Tris-Extrakt von *L. monocytogenes* geblottet worden. Die Proteinbande bei 70 kD wurde als P70, die Proteinbande bei 55 kD als IAP identifiziert.

3.2.4. Klonierung von P70

Um das Protein P70 für weitere Analysen in großen Mengen und aufgereinigter Form vorliegen zu haben, sollte der Genlocus *lmo2691*, der für P70 kodiert, kloniert und überexprimiert werden. Hierfür wurde der Expressionsvektor pMM verwendet, der einen His-Tag an die eingefügte Sequenz anhängt, über den man das Genprodukt aufreinigen kann..

Der Genabschnitt *lmo2691* wurde sowohl mit den Oligonukleotiden 5'PP70 NcoI und 3'P70 BglII als auch 5'OP70 NcoI und 3'P70 BglII durch PCR amplifiziert. Die Anlagerungstemperatur betrug für beide Ansätze 52 °C. Das erste Amplifikat war 2200 bp groß und beinhaltete zusätzlich die Promotorregion strangaufwärts des Startcodons von *lmo2691*, sowie die Restriktionsschnittstellen NcoI und BglII. Das zweite Amplifikat hatte eine Größe von 1800 bp und besaß ausschließlich den P70-kodierenden Bereich mit den Restriktionsschnittstellen NcoI und BglII. Über die Restriktionsschnittstellen wurden die PCR-Fragmente in den pMM-Vektor kloniert. Nach Transformation der Konstrukte in *E. coli* Tg2 wurden die Plasmide vervielfältigt und durch Minipräparation isoliert, aufgereinigt und bei – 20° aufbewahrt.

Die Quantifizierung der Proteinbande ergab in verschiedenen Extrakten von *L. monocytogenes* ebenso wie die Suche nach einer PrfA-Bindestelle auf DNA-Ebene keine Hinweise auf eine wichtige Rolle des P70 bei der Pathogenität von *L. monocytogenes*.

Von einer Massenkultivierung bestimmter Hybridomzellen und Aufreinigung der Antikörper, sowie weiteren Schritten bei der Klonierung und Expression wurde deshalb abgesehen.

3.3. Identifikation putativ PrfA-regulierter Proteine in Zellwandextrakten

Ein weiterer Ansatz, um neue Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* zu identifizieren, ist die Suche nach PrfA-regulierten Proteinen. Der positive Regulationsfaktor PrfA ist ein entscheidender Virulenzfaktor, der bereits ausführlich charakterisiert wurde (Dramsi *et al.*, 1993, Sheehan *et al.*, 1995). Er reguliert die Expression sämtlicher bisher bekannter an der Virulenz direkt und indirekt beteiligter Gene, wie von Cossart (2002) zusammengefaßt. Daher wurde in dieser Arbeit nach putativ PrfA-abhängig exprimierten Proteinen in Tris- und KSCN-Extrakten gesucht. Die serielle Extraktion durch Tris oder KSCN zeigte sich bereits als besonders geeignet, Zellwand-assoziierte Proteine anzureichern. Insgesamt konnten 31 Proteine mit Signalsequenz, darunter 21 Lipoproteine, identifiziert werden. Es wurde ein Vergleich der Gele des Wildtyps, der PrfA-Deletionsmutante und der konstitutiv PrfA überexprimierenden Mutante durchgeführt (Abbildung 3.12).

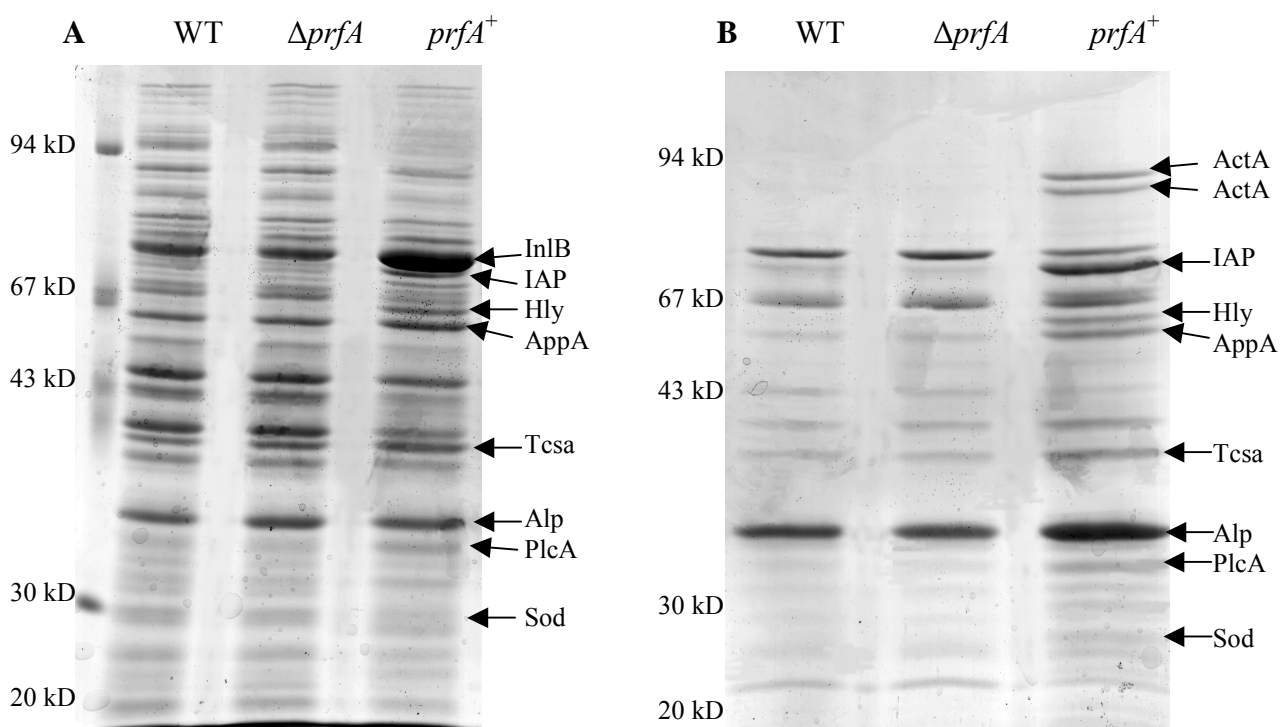


Abbildung 3.12: Identifikation putativ PrfA-regulierter Proteine der Zellwand-assoziierten Fraktion nach Tris- (A) und KSCN- (B) Extraktion. Verglichen wurden jeweils der *L. monocytogenes* Wildtyp (WT), die *prfA*-Deletionsmutante ($\Delta prfA$) und die konstitutiv *prfA* überexprimierende Mutante ($prfA^+$) in Coomassie gefärbten SDS-Gele. Eine Auflistung der identifizierten mit einem Pfeil markierten Proteine und deren relative Expressionsstärken findet sich in Tabelle 3.5 und 3.6.

Eine Auswertung der Coomassie-gefärbten Gele erfolgte mit der Software Phoretix. Die Expressionsstärken der Proteinbanden wurden verglichen und Banden, die im PrfA-überexprimierenden Stamm (*prfA*⁺) stärker als im Wildtyp auftraten, durch massenspektrometrische Analysen identifiziert. Der Expressionsunterschied wurde nach Normalisierung anhand des nicht PrfA-abhängigen Proteins Superoxiddismutase quantifiziert (Tabelle 3.5 und 3.6).

Von den Proteinen, die im *prfA*⁺-Stamm erhöhte relative Expressionsstärken zeigten, wurden die bereits bekannten PrfA-regulierten Virulenzfaktoren PlcA (Lmo0201), Listeriolysin (Lmo0202), ActA (Lmo0204) und Internalin B (Lmo0434) identifiziert. Des weiteren konnten als putative PrfA-reguliert die Lipoproteine AppA (Lmo0135), Iap (Lmo0582), TcsA (Lmo1388) und Lmo1847 gefunden werden. Für diese Proteine sind keine genauen Funktionen bekannt bzw. bisher nachgewiesen worden. Das Protein Lmo1847 besitzt in seiner Gensequenz strangaufwärts eine mögliche PrfA-Bindestelle und wurde daher in den folgenden Abschnitten genauer analysiert.

Tabelle 3.5: Identifizierte putativ PrfA-regulierte Proteine aus Gelen der Zellwand-assoziierten Proteine nach Tris-Extraktion (Abbildung 3.12 A). Angegeben sind jeweils die Volumina der Proteinbanden beim Wildtyp (WT), der *prfA*-Deletionsmutante ($\Delta prfA$) und der konstitutiv *prfA* überexprimierenden Mutante (*prfA*⁺). Eine Normalisierung der Daten wurde anhand der Proteinbande der Superoxiddismutase durchgeführt.

Protein	Gen	vorhergesagte Funktion	WT	$\Delta prfA$	<i>prfA</i> ⁺	Diff.(%)
Iap	Lmo0582	Invasions assoziiertes Protein P60	53	35	201	277
InlB	Lmo0434	Internalin B	229	197	899	291
Hly	Lmo0202	Listeriolysin	59	55	186	211
Appa	Lmo0135	Oligopeptid-Bindeprotein (ABC-Transporter)	132	125	305	131
TcsA	Lmo1388	T-Zell stimulierendes Antigen	118	1090	279	136
Alp	Lmo1847	Metall-Bindeprotein (ABC-Transporter)	180	182	394	119
Sod	Lmo1439	Superoxiddismutase	100	100	100	0

Tabelle 3.6: Identifizierte putativ PrfA-regulierte Proteine aus Gelen der Zellwand-assozierten Proteine nach KSCN-Extraktion (Abbildung 3.12 B). Angegeben sind jeweils die Volumina der Proteinbanden beim Wildtyp (WT), der *prfA*-Deletionsmutante ($\Delta prfA$) und der konstitutiv *prfA* überexprimierenden Mutante (*prfA*⁺). Eine Normalisierung der Daten wurde anhand der Proteinbande der Superoxiddismutase durchgeführt.

<i>Protein</i>	<i>Gen</i>	<i>vorhergesagte Funktion</i>	<i>WT</i>	<i>$\Delta prfA$</i>	<i>$prfA^+$</i>	<i>Diff. (%)</i>
ActA	Lmo0204	Aktin-Nukleationsfaktor	35	18	163	356
ActA	Lmo0204	Aktin-Nukleationsfaktor	42	30	163	285
Iap	Lmo0582	Invasions assoziiertes Protein P60	70	41	467	559
Hly	Lmo0202	Listeriolysin	44	38	188	322
Appa	Lmo0135	Oligopeptid-Bindeprotein (ABC-Transporter)	58	48	206	256
TcsA	Lmo1388	T-Zell stimulierendes Antigen	92	63	268	189
PlcA	Lmo0201	Phosphoinositol-spezifische Phospholipase C	58	39	222	281
Alp	Lmo1847	Metall-Bindeprotein (ABC-Transporter)	376	296	913	142

3.4. Analyse von Alp

In eindimensionalen Gelen wurde ein Protein unter den gewählten Bedingungen besonders stark exprimiert, welches zu Beginn dieser Arbeit bei Sequenzvergleichen eine Homologie zu einem Koaggregation-vermittelnden Adhäsion von *Streptococcus gordonii* zeigte und daher „adhesin like protein“ (Alp) genannt wurde. Identifiziert wurde dieses Protein zum ersten Mal bei einem Vergleich verschiedener *PrfA*-Mutanten als möglicherweise *PrfA*-reguliertes Protein (Siehe 3.3.). Die Bande des Alps, welches durch das Gen *lmo1847* kodiert wird, erschien in Tris-Extrakten von *L. monocytogenes* im konstitutiv *PrfA*-überexprimierenden Stamm stärker als im Wildtyp (Abbildung 3.13). Bei der Bandenstärke und Expression in der *PrfA*-Deletionsmutante war keine Veränderung zum Wildtyp zu erkennen. Dieses im Gel sichtbare Expressionsmuster korrelierte mit den Bandenstärken des InlBs, einem Zellwand-assoziierten Virulenzfaktor, der aber nicht ausschließlich *PrfA*-reguliert wird. InlB besitzt mindestens zwei Promotoren, von denen einer *PrfA*-abhängig ist (Lingnau *et al.*, 1995). Aufgrund dieser interessanten Parallele zu einem Virulenzfaktor wurde in dieser Arbeit die Regulation, Funktion und Expression von Alp genauer analysiert.

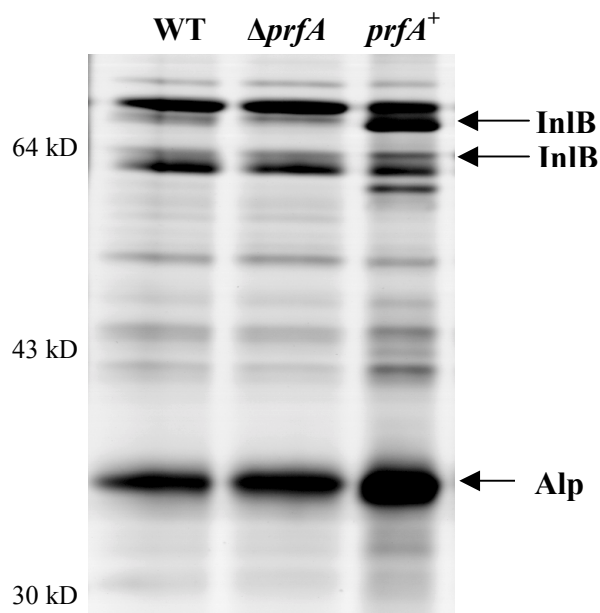


Abbildung 3.13: Expressionmuster von Alp in eindimensionalen SDS-Gelen. Beim Vergleich von elektrophoretisch aufgetrennten Tris-Extrakten aus *L. monocytogenes* Wildtyp (WT), der *PrfA*-Deletionsmutante ($\Delta prfA$) und dem konstitutiv *PrfA* überexprimierenden Stamm ($prfA^+$) zeigte sich bei $prfA^+$ eine stärkere Expression des Proteins Alp, ähnlich wie bei dem bekannten Virulenzfaktor InternalinB (InlB).

3.4.1. Untersuchung des Genlocus von Alp

Die Suche nach dem Alp-kodierenden Gen in der *Listeria*-Genomdatenbank (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>) ergab einen offenen Leserahmen mit einer Länge von 933 Basenpaaren. Die Analyse der umliegenden DNA-Abschnitte weist auf eine Organisation in einem Operon hin, bestehend aus drei Genloci. Die putative Operonstruktur im Genom wurde durch das Vorfinden eines Transkriptionsterminators strangabwärts vom Stopcodon des letzten Gens *lmo1847* und dem Fehlen dieser Terminatorsequenz nach den beiden ersten Genloci *lmo1848* und *1849* bestätigt. Bei allen drei Genen konnte eine potentielle Ribosomenbindestelle strangaufwärts vor dem Startcodon gefunden werden. Die weitere Suche nach einer Bindestelle des Transkriptionsaktivators PrfA, der Palindromsequenz TTAACANNTGTAA, war erfolgreich. Sie liegt 293 Basenpaare strangaufwärts vom Startcodon des Alp-Gens *lmo1847* als intragene PrfA-Box. Neben dem möglichen PrfA-Promotor vor *lmo1847* wurde 37 Basenpaare strangaufwärts vor dem Startcodon des ersten Gens *lmo1849* eine potentielle SigB-Bindestelle GTGTAA-N14-GGAAAA gefunden (Abbildung 3.14). SigB ist ein alternativer Sigma-Faktor, der mit der RNA-Polymerase oft bei Stressantworten assoziiert ist und so die Transkription/Translation reguliert (Fraser *et al.*, 2000). Für einen zusammenfassenden Überblick ist die Region um *lmo1847* in Abbildung 3.14 schematisch dargestellt.

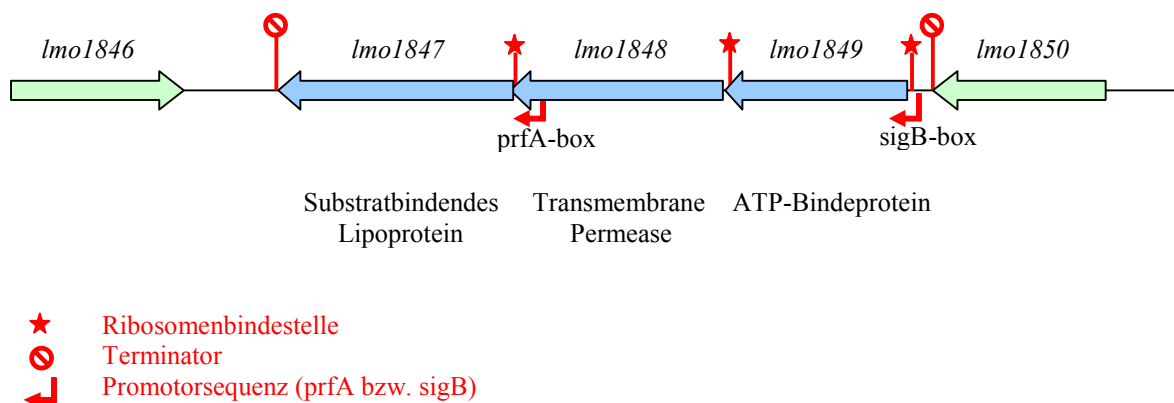


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der Region um *lmo1847* in Genom von *L. monocytogenes*.

Das erste dieser drei Gene im Operon *lmo1849* kodierte mit 741 Basenpaaren für ein ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters, was Homologiesuchen über BLAST zeigten. Bei dem zweiten offenen Leserahmen *lmo1848* mit 843 Basenpaaren handelte es sich laut BLAST-Suchergebnis um eine transmembrane Permease. Zu der 930 Basenpaare langen alp-Sequenz *lmo1847* fanden sich große Ähnlichkeiten zu Lipo –und Adhensionsproteinen von anderen Gram-positiven Bakterien. Die detaillierten Ergebnisse der Homologiesuche in der SwissProt-Datenbank sind im folgenden Abschnitt 3.4.2 in Abbildung 3.16 aufgelistet. Das Arrangement dieser drei kodierenden Bereiche ist charakteristisch für einen „ATP Binding Cassette“ (ABC) Transporter. Diese Proteinfamilie ist für eine Vielzahl physiologischer Funktionen in allen Spezies verantwortlich, bei denen ein ATP-abhängiger Transport von Molekülen aus dem umgebenden Milieu über die Zytoplasmamembran in die Zelle die Grundlage bildet.

Die flankierenden Gene *lmo1846* und *lmo1850* des Operons kodieren für ein hypothetisches konserviertes Protein mit putativer Transportfunktion und einen Transkriptionsregulator.

Innerhalb dieses Operons gibt es allerdings einen Leserahmenwechsel von *lmo1849* und *lmo1848* zu *lmo1847*. Der in der Genomdatenbank Listilist annotierte, kodierende Bereich des Permeasegens (Glaser *et al.*, 2001) überlappt mit zwei Basen die Alp-kodierende Sequenz.

3.4.2. Untersuchung der Aminosäuresequenz von Alp

Die Aminosäuresequenz von Alp wurde anhand der Sequenz des offenen Leserahmens von *lmo1847* vollständig ermittelt. Bestätigt wurde ein Teil dieser Sequenz durch N-terminales Ansequenzieren des Proteins aus Tris-Extrakten. Der N-Terminus lautete CSSQNSDSKKTDGK und fand sich in der translatierten DNA-Sequenz ab Position 19 wieder. Die davorliegenden 18 Aminosäuren stellen das Signalpeptid dar, welches beim Transport aus der Zelle vermutlich von der Signalpeptidase II abgespalten wird und somit in den Extrakten Zellwand-assoziiierter Proteine fehlt. Die Spaltungsstelle für die Signalpeptidase II wurde außerdem mit dem Programm SignalP (www.expasy.ch) übereinstimmend zu den experimentellen Ergebnis errechnet. Die Signalpeptidsequenz enthielt alle Charakteristika eines Signalpeptids von Lipoproteinen (Abbildung 3.15). Dazu gehören ein N-terminaler Abschnitt mit positiv geladenen Aminosäuren, eine zentrale hydrophobe Domäne und die Konsensussequenz LA(G,A)↓ C für die Abspaltung und den Verbleib eines N-terminalen Cysteins, an das die Fettsäure kovalent gebunden wird.

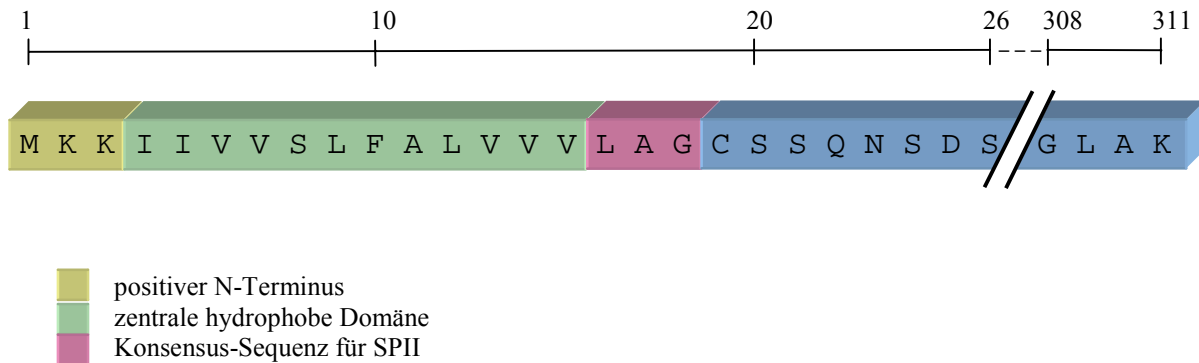


Abbildung 3.15: Darstellung der Signalpeptidsequenz von Alp und den charakteristischen Merkmalen eines Prelipoproteins. Die Spaltungsstelle für die Signalpeptidase II (SPII) befindet sich vor dem Cystein (C).

	(bit) value
tr U03756 Q47723 2EC868BF934EF276 Endocarditis specific antigen [Enterococcus faecalis]	356 2e-97
sp P42364 MTSA_STRGC D1DEAB1A060BC252 (SCAA) Metal ABC transporter substrate-binding lipoprotein precursor (Coaggregation-mediating adhesin).[Streptococcus gordonii]	347 9e-95
sp Q53891 MTSA_STRCR 14D8F7283ECF5936 (SCBA) Metal ABC transporter substrate-binding lipoprotein precursor.[Streptococcus cristatus]	343 1e-93
sp P31304 MTSA_STRSA 8FC8AF434AB18977 (SSAB) Manganese ABC transporter substrate-binding lipoprotein precursor (Adhesin B) (Saliva-binding protein).[Streptococcus sanguis]	342 4e-93
sp Q9CFZ5 MTSA_LACLA 9B146BFB15B3BD30 (MTSA..) Metal ABC transporter substrate-binding lipoprotein precursor.[Lactococcus lactis]	337 7e-92
tr AF454824 Q8KU66 98F27E76A83D88E3 (EF0095)EF0095.[Enterococcus faecalis]	331 5e-90
sp Q9L5X0 MTSA_STRMT 112423C9F4873D25 (PSAA) Manganese ABC transporter substrate-binding lipoprotein precursor (Pneumococcal surface adhesin A).[Streptococcus mitis]	331 5e-90
sp P31305 MTSA_STRPA 332F10BC858E8396 (FIMA) Manganese ABC transporter substrate-binding lipoprotein precursor (Adhesin B) (Saliva-binding protein).[Streptococcus parasanguis]	329 2e-89
sp Q9L5W9 MTSA_STROR 81F0C41F91E5C954 (PSAA) Manganese ABC transporter substrate-binding lipoprotein precursor (Pneumococcal surface adhesin A).[Streptococcus oralis]	329 2e-89

Abbildung 3.16: Ergebnis der Homologiesuche mit der Sequenz von *alp* (*lmo1847*). Die Suche wurde mit Hilfe von „BLAST at EMBLnet-CH“ (www.expasy.ch) in Swiss-Prot, TrEMBL und TrEMBL-new unter Standardparametern durchgeführt.

Das prozessierte Protein Alp besteht aus 292 Aminosäuren, deren Sequenz eine hohe Homologie mit einem Endocarditis-spezifischen Antigen von *Enterococcus faecalis* und substratbindenden Lipoproteinen von Metall-ABC-Transportern bei diversen *Streptococcus* Spezies (BLAST-Suche in Swiss-Prot, TrEMBL und TrEMBL-new) aufweist. Für diese Lipoproteine wird eine Bindestelle für Mangan oder Zink vorhergesagt, sowie eine mögliche Affinität zu Proteinen der extrazellulären Matrix. Das detaillierte Ergebnis der Homologiesuche ist in Abbildung 3.16 zu sehen. Wie Alp gehören alle diese Proteine zur Familie der periplasmatischen Bindeproteine (Pfam: SBP_bac_9) und besitzen eine Lipoprotein_4-Domäne.

Innerhalb der *Listeria* Spezies fand sich bei Vergleichen das identische Protein in *L. innocua* und *L. invanovii* und eine Homologie von 48 % zu einem weiteren unbekannten Protein von *L. monocytogenes*, Lmo0153, für das ebenfalls eine Funktion als Metall-Bindeprotein eines ABC-Transporters vermutet wurde.

3.4.3. Herstellung von Antikörpern gegen Alp

Für weitere Analysen des Proteins Alp wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Werkzeuge hergestellt und verwendet. Zum einen erfolgte die Herstellung von Antikörpern gegen Alp zur Quantifizierung des Proteins. Außerdem sollten hiermit qualitative Analysen durchgeführt werden, d.h. die Untersuchung einer An – und Abwesenheit des Proteins in bestimmten Extrakten oder unter bestimmten Bedingungen. Parallel hierzu wurde in Kooperation mit der Universität Giessen eine Alp-Deletionsmutante hergestellt, um die Funktionen des Proteins und seine Bedeutung in der Infektionsbiologie von *L. monocytogenes* aufzuklären (siehe 3.4.4).

Für die Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern wurden Peptide synthetisiert (Alp1 und Alp2, siehe 2.11.1), die eine möglichst hydrophile Sequenz und geringe Homologie zu anderen Listerien-Proteinen besitzen. Diese wurden an Ovalbumin gekoppelt und Kaninchen bzw. Mäuse damit immunisiert. Die Immunisierung der Kaninchen zur Gewinnung von polyklonalen Seren wurde von der Firma Eurogentec übernommen. Die Seren wurden 1:100 verdünnt durch ELISA auf Maxisorp-Platten, die mit den Peptiden beschichtet waren, getestet. Als Negativ-Kontrolle dienten die Praeimmunisierungsseren. Die stärksten Signale waren bei den Seren der beiden Kaninchen, die gegen Alp2 immunisiert worden waren, zu beobachten. Die Antikörper aus den zugesendeten Seren wurden mit Hilfe

von CNBr-Sepharose aufgereinigt. Die gepoolten Fraktionen wurden umgepuffert, aufkonzentriert und erneut im ELISA in verschiedenen Verdünnungen getestet. Die optimale Verdünnung für eine Detektion im ELISA für α Alp2 wurde mit 1:2000, für eine Detektion auf dem Westernblot eine Verdünnung mit 1:500 bestimmt.

Eine Detektion des denaturierten Alps durch α Alp2 konnte in Westernblots gezeigt werden (Abbildung 3.17). Bei Proteinextrakten der Deletionsmutante *Almo1847*, die kein Alp exprimiert, war kein Signal zu erkennen und belegt die spezifische Bindung des Antikörpers.

Die Bindung des α Alp2 wurde auch auf Maxi- und Polysorp-Platten mit verschiedenen Proteinextrakten im ELISA getestet. Dieser erheblich sensitivere Test mit nativen Proteinen zeigte auch ein positives Signal bei der Deletionsmutante. Die polyklonalen Antikörper kreuzreagieren anscheinend mit weiteren Bestandteilen der Proteinextraktes. Der polyklonale Antikörper α Alp2 ist daher für eine spezifischen Nachweis des Alps geeignet, allerdings nicht zur Quantifizierung des Proteins.

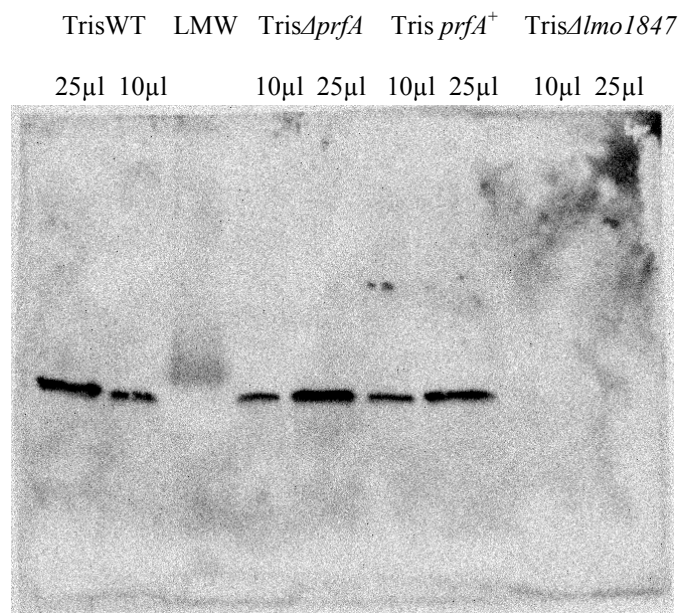


Abbildung 3.17: Detektion von Alp mit dem polyklonalen Antikörper α alp2 im Westernblot. Anhand von Tris-Extrakten des *L. monocytogenes* Wildtyp (WT), der *prfA*-Deletionsmutante ($\Delta prfA$), der konstitutiv PrfA überexprimierenden Mutante (*prfA*⁺) und der *alp*-Deletionsmutante (*Almo1847*) wird eine spezifische Erkennung des Alps gezeigt. Aufgetragen wurden jeweils 10 und 25 µl eines Tris-Extrakt, welches ungefähr einer Menge von 1,5 und 3,75 µg

Für eine Quantifizierung des Alps sollten spezifischere monoklonale Antikörper hergestellt werden. Die Kulturüberstände der Antikörper-produzierenden Zellen wurden im ELISA auf eine Reaktion mit dem Peptid getestet. Die ausgewählten Mischklone wurden auf Tris-Extrakten im Immunoblot auf ihre Bindungsspezifität untersucht. Kein Klon, der zuvor zwar das Peptid erkannte, konnte an das denaturierte Protein auf der Blotmembran binden. Im

ELISA mit Poly-oder Maxisorpplatten konnte dagegen eine Bindungsreaktion detektiert werden, vermutlich da hier die Proteine nativ vorliegen. Allerdings sah man auch hier eine deutliche Reaktion bei den Extrakten der Deletionsmutante *Δlmo1847*, die das spezifische Antigen nicht exprimiert. Wahrscheinlich kommt es auch hier zu Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen. Die monoklonalen Antikörper waren nicht für qualitative Analysen im Westernblot zu verwenden. Daher wurde in den folgenden Experimenten stets der polyklonale Antikörper α alp2 für den spezifischen Nachweis einer Alp-Expression eingesetzt. Eine Quantifizierung des Alps im ELISA war aufgrund ihrer Kreuzreaktivität weder mit den mono- noch den polyklonalen Antikörper möglich.

3.4.4. Charakterisierung einer Alp-Deletionsmutante

Neben der Herstellung von Antikörpern (siehe 3.4.6) wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Trinad Chakraborty in Gießen eine *Alp*-Deletionsmutante (*Δlmo1847*) wie in der Literatur beschrieben (Chakraborty *et al.*, 1995, Lingnau *et al.*, 1995) generiert. Mit Hilfe dieser Mutante (Abbildung 3.18) sollten Hinweise auf die Funktion des Proteins und seiner Rolle im Infektionszyklus von *L. monocytogenes* erhalten werden. Daher erfolgte eine Charakterisierung von *Δlmo1847* durch Wachstumsversuche in Flüssigkultur, Infektionsassays und eine Analyse des Expressionsmusters jeweils im Vergleich zum *L. monocytogenes* Wildtyp durchgeführt. Zur Vervollständigung der Daten sollte ursprünglich auch eine komplementierte Deletionsmutante bei den Versuchen eingesetzt werden. Diese wurde ebenfalls in Gießen hergestellt, zeigte jedoch keine detektierbare Expression von *lmo1847* in SDS-Gelen oder Westernblots.

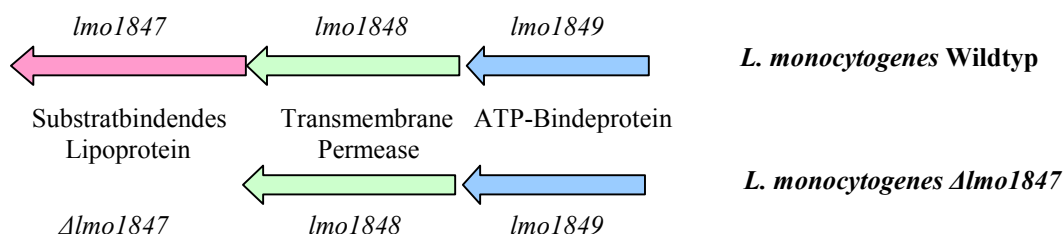


Abbildung 3.18: Vereinfachte Darstellung der Deletionsmutante *Δlmo1847* von *L. monocytogenes* im Vergleich zum Wildtyp.

3.4.4.1. Wachstumskurve

Zur Überprüfung der allgemeinen Vitalität und Vermehrungsfähigkeit der Deletionsmutante *Δlmo1847* wurden Wachstumskurven von Schüttelkulturen durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm erstellt. Ein Vergleich der Wachstumskurve von *L. monocytogenes* WT und *Δlmo1847* erfolgte in BHI-Medium (Vollmedium) und Minimal-Medium. Die Schüttelkulturen wurden bei der optimalen Wachstumstemperatur von 37°C, bei Kälteschock-induzierenden 25 °C und 5 °C als extrem niedrige Temperatur, bei der nur wenige Bakterien wie z.B. Listerien überhaupt wachsen, inkubiert.

Die Mutante *Δlmo1847* wuchs bei allen gewählten Temperaturen und in beiden Nährmedien an. Eine essentielle Funktion des Alps für das Überleben und Vermehren von *L. monocytogenes* ist daher auszuschließen. Ein signifikanter Unterschied im Verlauf der Wachstumskurve bzw. der Wachstumsrate vom Wildtyp zu *Δlmo1847* war ebenfalls nicht zu erkennen (Abbildung 3.19). Die lag-Phase verlief sehr ähnlich. Die Mutante wies nur eine leichte Verzögerung in der exponentiellen Wachstumsphase bei allen Temperaturen auf. Außerdem erreichte der Wildtyp reproduzierbar mit der stationären Phase jeweils eine höhere optische Dichte als *Δlmo1847*. In BHI-Medium wuchs der Wildtyp immer bis zu einer OD von 2,0 bis 2,2, die Mutante dagegen bis zu einer OD von 1,8 bis 2,0.

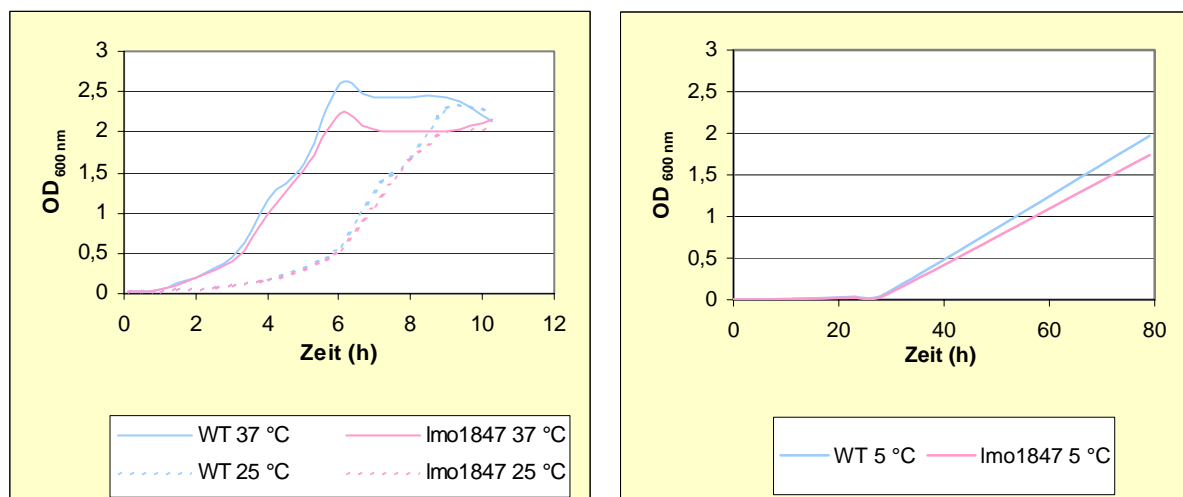


Abbildung 3.19 : Wachstumskurve von *L. monocytogenes* Wildtyp (WT) und *Δlmo1847* (lmo1847) in BHI-Medium bei 37, 25 (links) und 5 °C (rechts).

3.4.4.2. Infektion

Um den Einfluß von Alp auf den Infektionszyklus von *L. monocytogenes* zu analysieren wurden Infektionsassays durchgeführt. Dabei konnte sowohl die Invasivität des Wildtyps mit der Deletionsmutante $\Delta lmo1847$ verglichen werden, als auch die intrazelluläre Vermehrung. Um Vorgänge der Listerien in den Wirtszellen zu vergleichen wurden außerdem fluoreszenzmikroskopische Bilder infizierter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen. Als Wirtszellen wurde die Nierenepithelzelllinie Vero aus Affen eingesetzt. Die Anzahl der eingedrungen Bakterien wurde bestimmt und zur statistischen Auswertung in einem Box-Whisker-Plot (Box-Plot) dargestellt (Abbildung 3.20). Der Mittelwert der Invasionzahlen ist durch die Linie im grauen Rechteck markiert, die Standardabweichung durch die Arme darüber und darunter. Die schwarzen Punkte sind stark abweichende Einzelwerte. Der Box-Plot gibt Auskunft über die Häufigkeitsverteilung der Werte. Bei dem Invasivitätsdaten zeigte sich eine normale Verteilung, die für die Durchführung des T-Tests („student’s test“) notwendig ist. Der T-Test stellt die Differenz der arithmetischen Mittelwerte anhand von Stichproben dar, welches durch den Wert P wiedergegeben wird. Ist dieser P-Wert $< 0,1$, so unterscheiden sich die Werte statistisch signifikant.

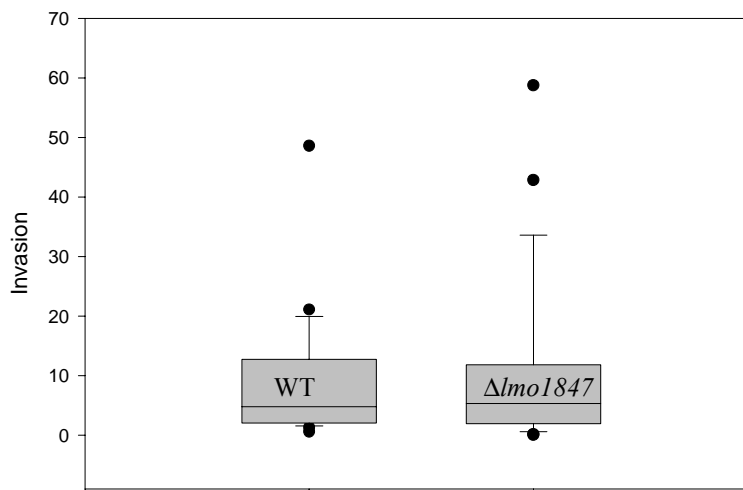
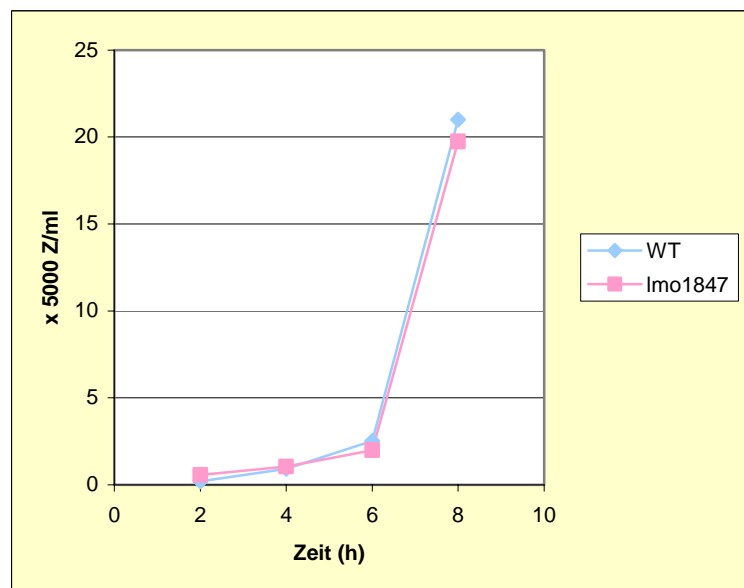


Abbildung 3.20: Box-Whisker-Plot der Invasivität von *L. monocytogenes* EGD Wildtyp (WT) und $\Delta lmo1847$ in Verozellen.

Die Invasivität der Mutante in Verozellen unterschied sich nicht signifikant vom Wildtyp ($P > 0,05$), d.h. die Anzahl intrazellulärer Listerien 1 Stunde nach der Infektion war bei beiden Stämmen gleich. Eingerechnet wurden hierfür 19 voneinander unabhängig durchgeführte Gentamycinassays. Der T-Test dieser Daten ergab einen Wert $P = 0,857$. Damit wurde statistisch nachgewiesen, dass es zwischen der Invasivität der Mutante *Δlmo1847* und dem Wildtyp keine signifikanten Unterschiede auftraten.

Abbildung 3.21: Intrazelluläres Wachstum von *L. monocytogenes* EGD Wildtyp (WT) und *Δlmo1847* (lmo1847) nach Infektion in Verozellen.



Die intrazelluläre Wachstumsrate innerhalb von 8 Stunden nach der Infektion von Wildtyp und *Δlmo1847* war ebenfalls identisch (Abbildung 3.21). Neben Verozellen wurden als Wirtszelllinien außerdem HeLa (humane Epithelzellen des Adenokarzinoms) (Abbildung 3.22) und Ptk2 (Nierenepithelzellen der Beutelratte) (Abbildung 3.23) eingesetzt, die ein übereinstimmendes Ergebnis lieferten. Das Protein Alp scheint unter den gewählten Bedingungen keine essentielle Rolle in der Infektion von *L. monocytogenes* in Epithelzellen *in vitro* zu spielen.

Abbildung 3.22: Intrazelluläres Wachstum von *L. monocytogenes* EGD Wildtyp (WT) und $\Delta lmo1847$ (lmo1847) nach Infektion in HeLa-Zellen.

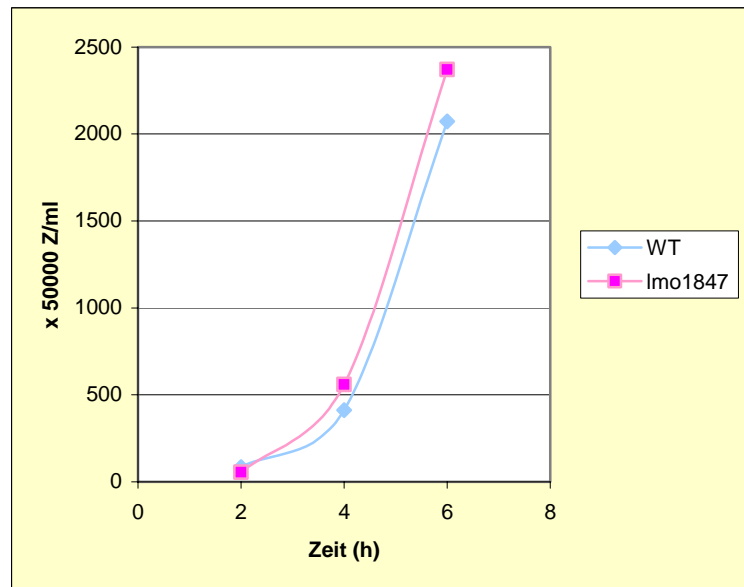
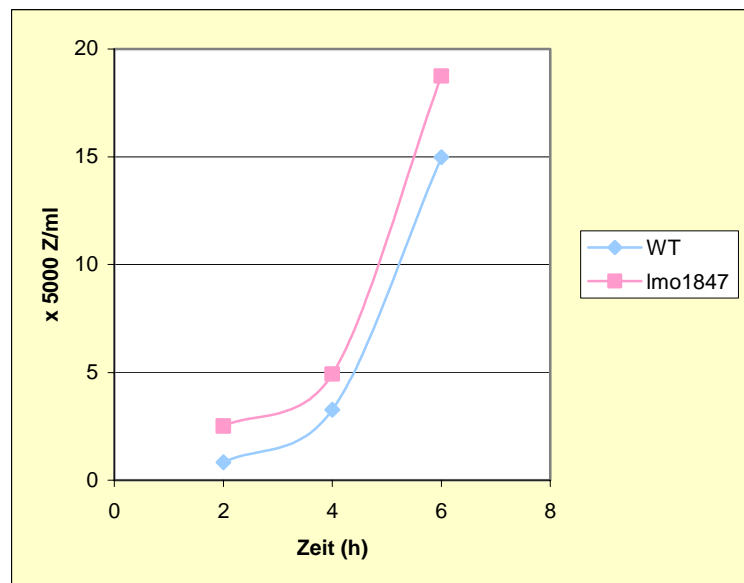


Abbildung 3.23: Intrazelluläres Wachstum von *L. monocytogenes* EGD Wildtyp (WT) und $\Delta lmo1847$ (lmo1847) nach Infektion in Ptk2-Zellen.



Um zu kontrollieren, dass intrazellulär keine Veränderungen in der Fortbewegung, Aktinschweifbildung und Verbreitung durch die Mutation auftraten, wurden Epithelzellen 2, 4 und 6 Stunden nach der Infektion fixiert. Anschließend erfolgte eine Präparation, die eine Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht. Durch spezifische Antikörper und fluoreszierende Markierung erschienen die Listerien grün und die Aktinfilamente rot, wie in Abbildung 3.24 zu sehen ist. Ein Vergleich der Aufnahmen zeigte keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und $\Delta lmo1847$.

Sowohl bei der Invasion als auch beim intrazellulären Verhalten zeigte die Deletion des Alp-Gens keine erkennbaren Auswirkungen.

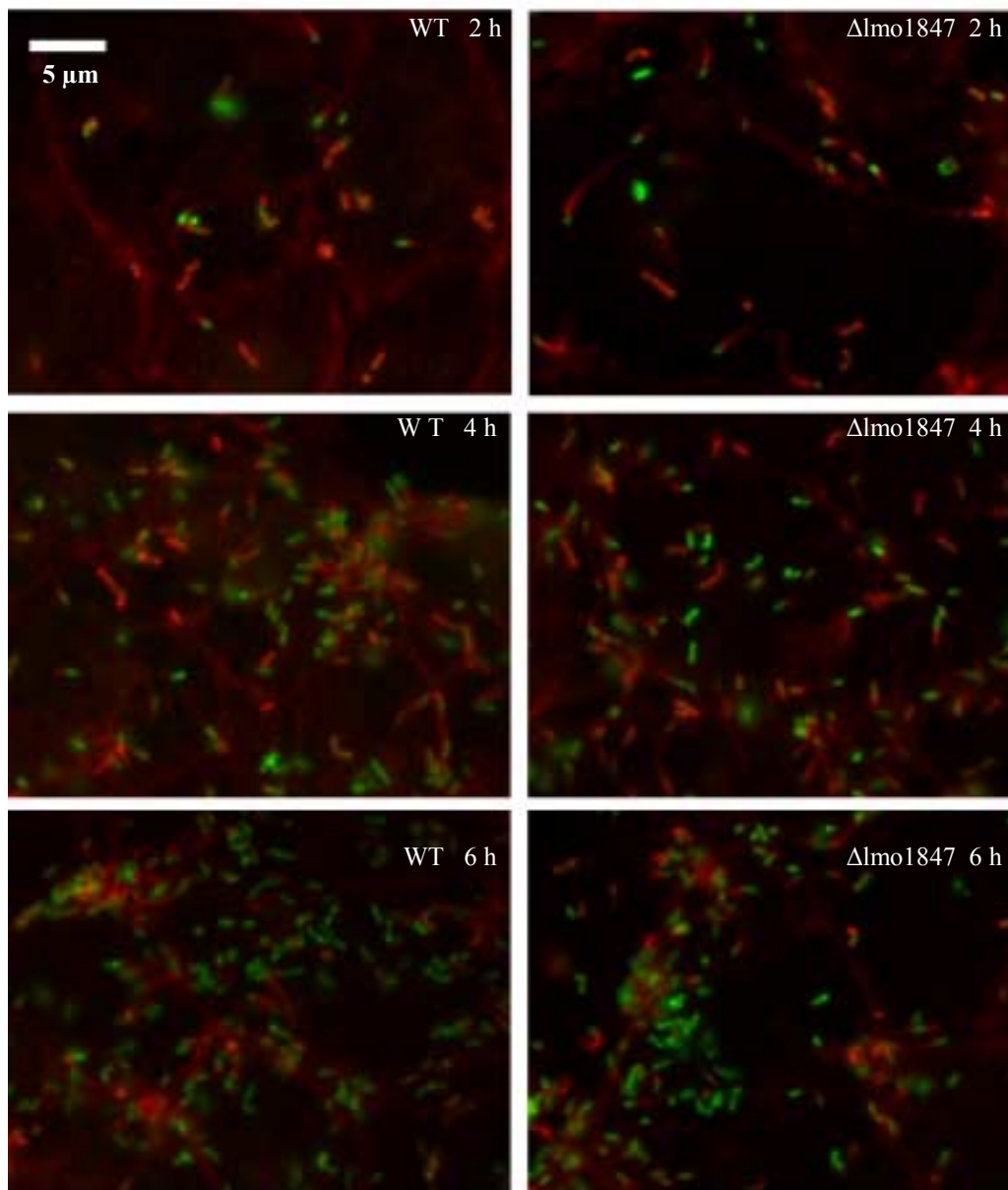


Abbildung 3.24: Intrazelluläre Fortbewegung von *L. monocytogenes* in Verozellen. Verozellen wurden jeweils mit *L. monocytogenes* EGD Wildtyp (WT) und $\Delta lmo1847$ infiziert und nach 2, 4 und 6 Stunden fixiert. Filamentöses Aktin (rot) wurde mit Phalloidin und die Listerien mit Antikörpern (grün) angefärbt. Die Aktinschweifbildung und Verteilung der Mutante unterschied sich nicht vom Wildtyp.

3.4.4.3 Expressionsanalyse durch Proteomics

Die Deletion des Alp-kodierenden Gens *Lmo1847* zeigte keinen signifikanten Einfluß auf das Wachstum in Flüssigkultur und intrazellulär, sowie die Invasivität der Listerien. Damit ist Alp nicht essentiell für das Überleben von *L. monocytogenes*. Eine Erklärung hierfür wären Proteine, die die Funktion von Alp kompensiert bzw. ersetzen können. Alp wurde aufgrund seiner Sequenzeigenschaften als Lipoprotein klassifiziert und durch Homologien und Organisation im Genom als Zink- oder Manganbindender Bestandteil eines ABC-Transporters identifiziert. In *L. monocytogenes* EGDe konnten anhand der Genomsequenz 50 ORFs gefunden werden, die für Bestandteile von ABC-Transportern kodieren. Darunter fand sich auch ein putatives Zink-Transportsystem, bestehend aus lmo0153, lmo0154 und lmo0155. Der vorhergesagte Aufbau ähnelte dem Alp-Operon mit einem Zink- bzw. Mangan-bindenden Lipoprotein, einem ATP-Bindeprotein und einer transmembranen Permease und könnte somit auch eine ähnliche Funktion besitzen. Um die Auswirkung der Deletion auf die Regulation zu analysieren und möglicherweise kompensierende Proteine im Organismus zu finden, wurden 2D-Gele von Wildtyp- und Δ *lmo1847*-Proteinextrakten angefertigt. Hierfür wurden Oberflächenproteinextrakte nach Inkubation der Listerien mit Tris und KSCN verwendet, weil Alp in diesen Extrakten am stärksten hervortrat und eine mögliche Kompensation auch durch ähnliche Proteine in der gleichen Fraktion vermutet wurde.

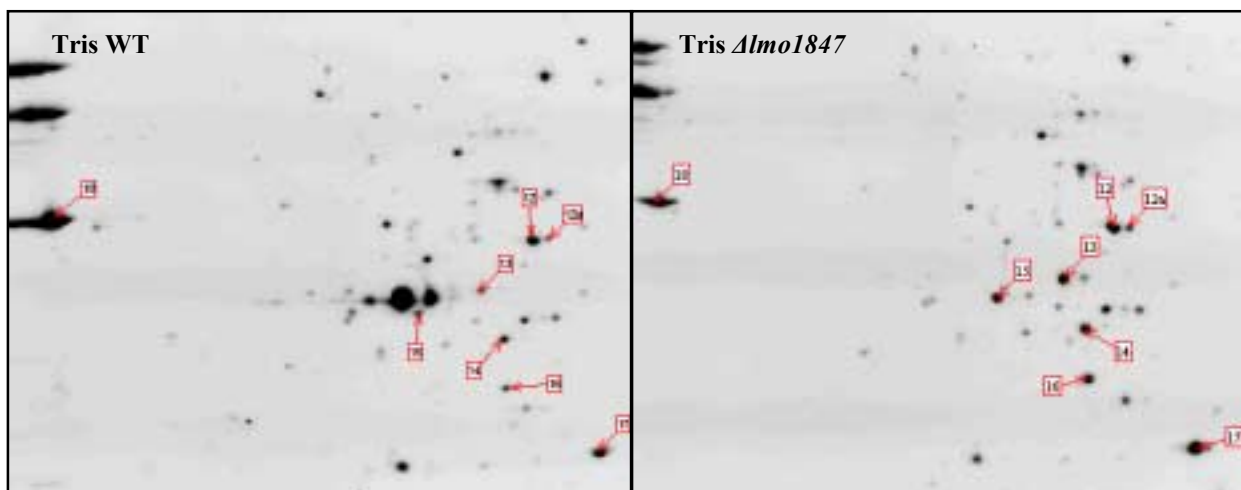


Abbildung 3.25: Differentielle Expression in 2 D-Gelen von Tris-Extrakten aus *L. monocytogenes*. Zweidimensional aufgetrennt wurden Oberflächenproteine nach Tris-Extraktion von *L. monocytogenes* Wildtyp (WT) und der Mutante Δ *lmo1847*. Die markierten Proteinspots zeigten im Vergleich der Stämme in Phoretix unterschiedliche Volumina. Die dazugehörige Identifikation, Volumen und Volumendifferenz sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

Tabelle 3.7: Differentiell exprimierte Proteine in der Deletionsmutante $\Delta lmo1847$ im Vergleich zum Wildtyp von *L. monocytogenes*. Aus 2D-Gelen mit Oberflächenproteinen aus der Tris-Extraktion wurden Spots identifiziert, die im Vergleich *L. monocytogenes* $\Delta lmo1847$ (Δ) und Wildtyp (WT) unterschiedlich exprimiert wurden. Die Expressionsstärke wurde als Volumen (Vol.) und die Expressionsunterschiede als Differenz (Diff.) mit der Software Phoretix ermittelt. Die normalisierten Werte sind korrespondierend dazu aufgelistet (N). Ein positives Vorzeichen der Differenz zeigt eine Hochregulation im Wildtyp an, ein negatives Vorzeichen die Hochregulation in der Mutante.

Spot	Gen	Funktion	Vol. Δ	Vol. WT	Diff.	NVol. Δ	NVol. WT	NDiff.
12	Lmo1388	T-Zell stimulierendes Antigen TCSA	18057	13544	33,3	209,12	170,25	22,8
12a	Lmo1388	T-Zell stimulierendes Antigen TCSA	3462	1730	100,1	61,37	27,87	120,2
13	Lmo2431	ABC-Transporter, ferrichrom, Bindeprotein	12526	3316	277,7	145,07	41,68	248,0
14	Lmo1738	Aminosäure ABC-Transporter	11908	5726	108,0	137,91	71,98	91,6
15	Lmo2637	unbekannt, konserviertes Lipoprotein	11918	1778	570,0	138,03	22,35	517,6
16	Lmo1041	ABC-Transporter, Molybdat Bindeprotein	9920	3655	171,4	114,89	45,94	150,1
17	Lmo0791	Unbekannt	21600	13052	65,5	250,16	164,07	52,5
18	Lmo2505	Spl, Peptidoglycan lytisches Protein P45	26909	123844	-78,3	311,65	1556,70	-80,0

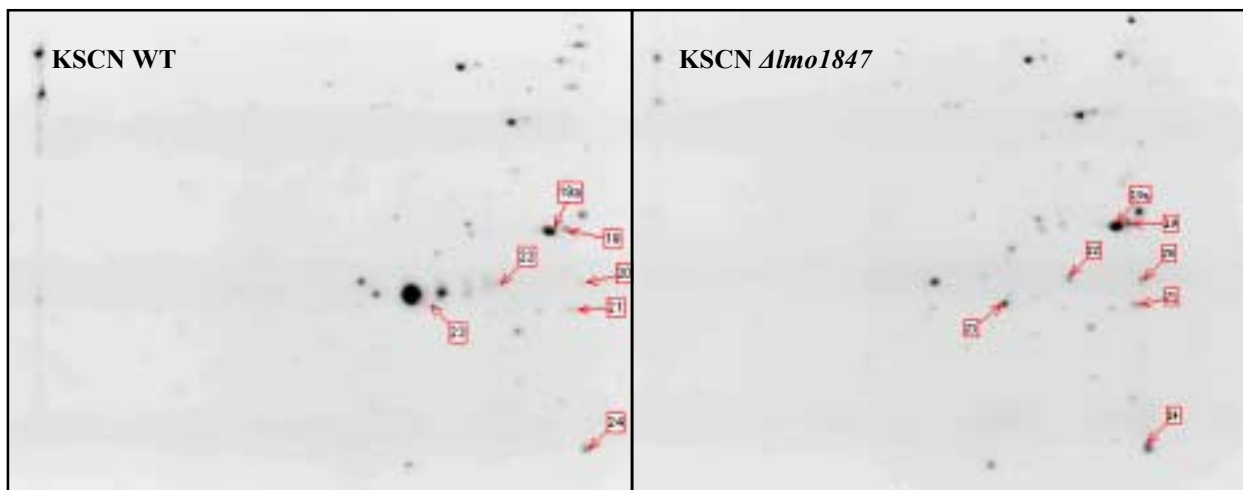


Abbildung 3.26: Differentielle Expression in 2 D-Gelen von KSCN-Extrakten aus *L. monocytogenes*. Zweidimensional aufgetrennt wurden Oberflächenproteine nach KSCN-Extraktion von *L. monocytogenes* Wildtyp (WT) und der Mutante $\Delta lmo1847$. Die markierten Proteinspots zeigten im Vergleich der Stämme in Phoretix unterschiedliche Volumina. Die dazugehörige Identifikation, Volumen und Volumendifferenz sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8: Differentiell exprimierte Proteine in der Deletionsmutante *Δlmo1847* im Vergleich zum Wildtyp von *L. monocytogenes*. Aus 2D-Gelen mit Oberflächenproteinen aus der KSCN-Extraktion wurden Spots identifiziert, die im Vergleich *L. monocytogenes* *Δlmo1847* (Δ) und Wildtyp (WT) unterschiedlich exprimiert wurden. Die Expressionsstärke wurde als Volumen (Vol.) und die Expressionsunterschiede als Differenz (Diff.) mit der Software Phoretix ermittelt. Die normalisierten Werte sind korrespondierend dazu aufgelistet (N). Ein positives Vorzeichen der Differenz zeigt eine Hochregulation im Wildtyp an, ein negatives Vorzeichen die Hochregulation in der Mutante.

Spot	Gen	Funktion	Vol.Δ	Vol.WT	Diff.	NVol.Δ	NVol.WT	NDiff.
19	Lmo1388	T-Zell stimulierendes Antigen TCSA	4944	2487	98,8	148,37	82,66	79,5
19a	Lmo1388	T-Zell stimulierendes Antigen TCSA	17127	13561	26,3	513,98	450,74	14,0
20	Lmo2714	Quecksilber-Reduktase, LPXTG Motiv	2249	465	383,7	67,49	15,46	336,7
22	Lmo2431	ABC-Transporter, ferrichrom, Bindeprotein	2793	1239	125,4	83,82	41,18	103,5
23	Lmo0541	ABC-Transporter, ferrichrom, Lipoprotein	5440	938	480,0	163,26	31,18	423,6
24	Lmo0791	unbekannt	7805	3910	99,6	234,23	129,96	80,2

Das 2D-Muster des Wildtyps und der Mutante wurde mit der Software Phoretix Professional 2D analysiert. Die Spotvolumina der einander zugeordneten „gematchten“ Proteinspots wurden berechnet. Zur Errechnung der differentiellen Genexpression wurden sowohl die absoluten Spotvolumina verglichen, als auch die normalisierten Volumina. Eine Normalisierung erfolgte anhand des Gesamtpotvolumens aller gemeinsamen Spots. Eine positive Differenz in Prozent bedeutet eine Zunahme der Expression in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp, eine negative Differenz eine Abnahme.

Insgesamt wurden 13 Proteinspots reproduzierbar gefunden, deren Volumen bzw. Expressionstärke in der Mutante deutlich größer war. Diese korrespondieren zu acht verschiedenen Proteinen, die durch massenspektrometrische Verfahren identifiziert wurden. In Abbildung 3.25 und 3.26 sind diese Proteinspots in den 2D-Gele markiert und ihre Volumina, sowie der Expressionsunterschied in Tabelle 3.7 und 3.8 aufgelistet. Nur ein Protein, das Peptidoglycan-lytische Protein P45, wurde im Wildtyp stärker exprimiert als in der Deletionsmutante. Alle identifizierten Proteine waren sekretorische Proteine mit einer vorhergesagten Signalsequenz. 8 dieser Proteine waren Lipoproteine, wovon drei Lipoproteine die Metallionen-bindenden Teile verschiedener ABC-Transporter waren. Ein weiteres Lipoprotein war ein Aminosäure-bindendes Transporterprotein. Die Hochregulation anderer ABC-Transportproteine in der Alp-Deletionmutante wies auf eine mögliche Übernahme der Funktion von Alp hin.

3.4.5. Charakterisierung einer Lipidmodifikation von Alp

Die Sequenzanalyse von Alp bzw. lmo1847 ergab eine hohe Ähnlichkeit zu Lipoproteinen aus anderen Gram-positiven Bakterien. Auch der Aufbau des Signalpeptids ist charakteristisch für ein Lipoprotein. Der Nachweis einer Lipidmodifizierung von Alp wurde durch radioaktive Markierung durchgeführt. *L. monocytogenes* wurde mit Zusatz von ^3H -markierter Palmitinsäure in Flüssigmedium angezogen. Durch Isolierung der Zellwand- und Membranfraktion wurden sämtliche Lipoproteine angereichert und auf SDS-Gelen eindimensional elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 3.27 A). Nach Transfer des Proteinbandenmusters auf eine PVDF-Membran wurde diese mit Hilfe eines TLC-Geräts abgescannt. Dabei wurden mindestens fünf Banden von Proteinen sichtbar, die Radioaktivität eingebaut hatten. Eine dieser Banden wurde bei ca. 34 kD detektiert und lag somit auf der gleichen Höhe wie die mit dem polyklonalen Antikörper αalp2 detektierte Bande (Abbildung 3.27 B). Das theoretische Molekulargewicht von Alp ohne Signalpeptid beträgt 34,5 kD und bestätigt die Vermutung, dass Alp eine Lipidmodifizierung besitzt, die in diesen Extrakten durch ^3H -Palmitinsäure markiert ist.

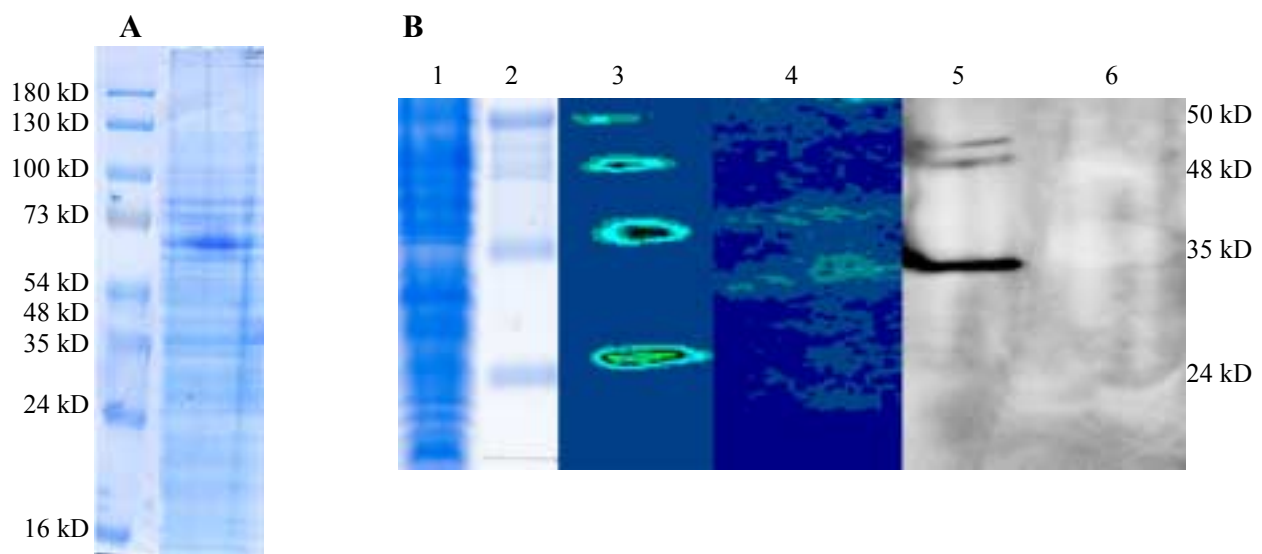


Abbildung 3.27: Detektion von Lipoproteinen durch Einbau ^3H -markierter Palmitinsäure. Hergestellt und elektrophoretisch aufgetrennt wurden radioaktive Fraktionen von *L. monocytogenes*, die Zellwand- und Zellmembranbestandteile enthielten. Anschließend wurde das SDS-Gel Coomassie gefärbt (A), geblottet und sowohl die Radioaktivität durch den TLC-Scan als auch das Alp durch αalp2 detektiert (B). 1 = coomassiegefärbter Extrakt, 2 = Molekulargewichtsstandard, 3 = mit ^3H -Palmitinsäure nachgezeichneter Molekulargewichtsstandard, 4 = radioaktive Signale des Extrakts, 5 = αalp2 -entwickelter Extrakt, 6 = Molekulargewichtsstandard

3.4.6. Affinität von Alp zu zweiwertigen Metallionen

Aufgrund des genetischen Arrangements von alp und den Ergebnissen der Homologiesuche wurde eine Funktion als Metallionen-bindender Teil eines ABC-Transporters vermutet. Der Nachweis einer Lipidmodifikation im vorherigen Abschnitt bekräftigt dies. Eine weitere Bestätigung für die Funktion wäre der Nachweis einer Affinität des Alps für bestimmte Metallionen, wie z.B. Mangan, welches für das homologe Protein SCAA von *Streptococcus gordonii* gezeigt wurde (Kolenbrander *et al.*, 1998). Um eine mögliche Affinität von Metallionen zu Alp nachzuweisen, wurde Chelatsepharose mit zweiwertigem Zink oder Mangan beladen. Über diese Sepharosesäule wurden in FPLC-Läufen Zellwandextrakte aus endolytischem Verdau gegeben und anschließend mit Imidazol eluiert. Mit den aufkonzentrierten Eluaten wurden sowohl eindimensionale Coomassie gefärbte SDS-Gele als auch Westernblots hergestellt. In der Coomassiefärbung wurden drei Banden bei ca. 34, 26 und 20 kD angefärbt (Abbildung 3.28). Die Ergebnisse mit der Zn^{2+} -Chelatsepharose waren identisch mit dem Mn^{2+} -Ansatz. Mit dem polyklonalen Antikörper αalp2 konnten zwei starke Signale ebenfalls bei 34 und 26 kD im Immunoblot detektiert werden (Abbildung 3.29). Bei Verwendung von unbeladener Sepharose oder Inkubation der Zn^{2+} -bzw. Mn^{2+} -Sepharose mit Extrakten der Alp-Deletionsmutante Δmo1847 lieferte der Antikörper keine Signale. Es konnte eine spezifische Bindung von Alp an zweiwertige Zink- und Manganionen gezeigt werden.

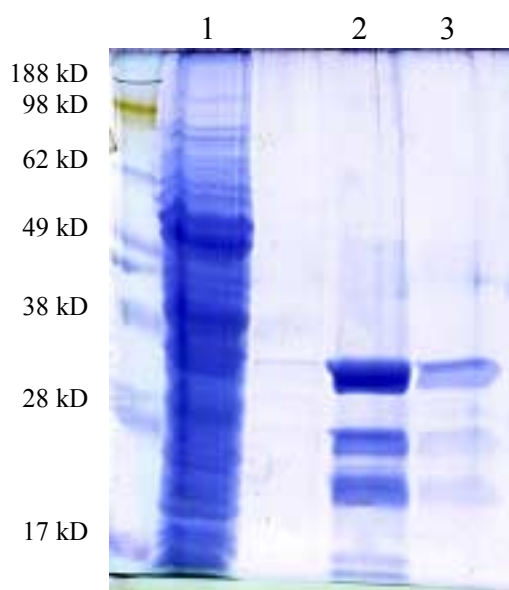
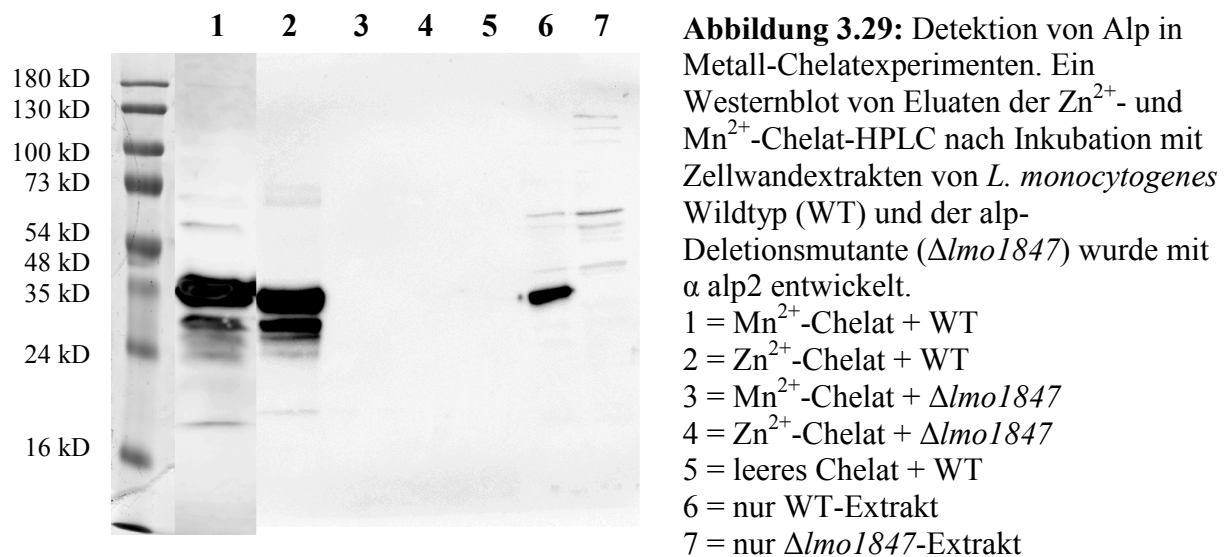


Abbildung 3.28: Bindung zwischen Metallionen und Proteinen der Zellwand. Durch endolytischen Verdau hergestellte Zellwandextrakte von *L. monocytogenes* wurden über eine Zn^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Chelatsäule gegeben und gebundene Protein mit Imidazol eluiert. Der Zellwandextrakt (1), das Eluat der Zn^{2+} -Säule (2) und das Eluat der Mn^{2+} -Säule (3) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.



3.3.8. Weitere Bestandteile des ABC-Transporterkomplexes

Das Protein Alp ist der substratbindende Teil eines ABC-Transporters in *L. monocytogenes*. Die Deletion des Alp-Gens sollte sich also auf das gesamte Operon bzw. die Bildung des gesamten Transporterkomplexes auswirken. Um die anderen Bestandteile, die transmembrane Permease Lmo1848 und das ATP-Bindeprotein Lmo1849, und deren Regulation zu analysieren, wurden Blau Native Gele hergestellt. Mit dieser Elektrophorese-Methode lassen sich Proteinkomplexe mit hydrophilen Bestandteilen auftrennen und einander zuordnen. Der Vergleich der beiden Blau Nativen Gele zeigte im Gel des Wildtyps einen zusätzlichen Spot, der wie erwartet als Alp durch Mikrosequenzierung im Q-TOF identifiziert werden konnte (Abbildung 3.30).

Für die Permease Lmo1848 wird ein Molekulargewicht von 30.17 kD, für das ATP-Bindeprotein Lmo1849 26.49 kD vorhergesagt. Spots, die auf einer vertikalen Linie mit Alp liegen, kommen als mögliche Komplexbestandteile in Frage. Aus diesem Bereich der Gele wurden mehrere Proteinspots ausgestochen und per Mikrosequenzierung im Q-TOF identifiziert (Daten nicht gezeigt). Darunter befand sich weder Lmo1848 noch Lmo1849. Das Protein Alp zeigte sich in den Gelen nicht sauber aufgetrennt, was auf einen hydrophoben Charakter hindeutet. Hydrophobe Bestandteile erschweren die Darstellung eines gesamten Proteinkomplexes und machen es im Falle dieses ABC-Transporters wahrscheinlich unmöglich. Daher wurden keine weiteren Analysen mit dem Verfahren der Blau Nativen Gelelektrophorese durchgeführt.

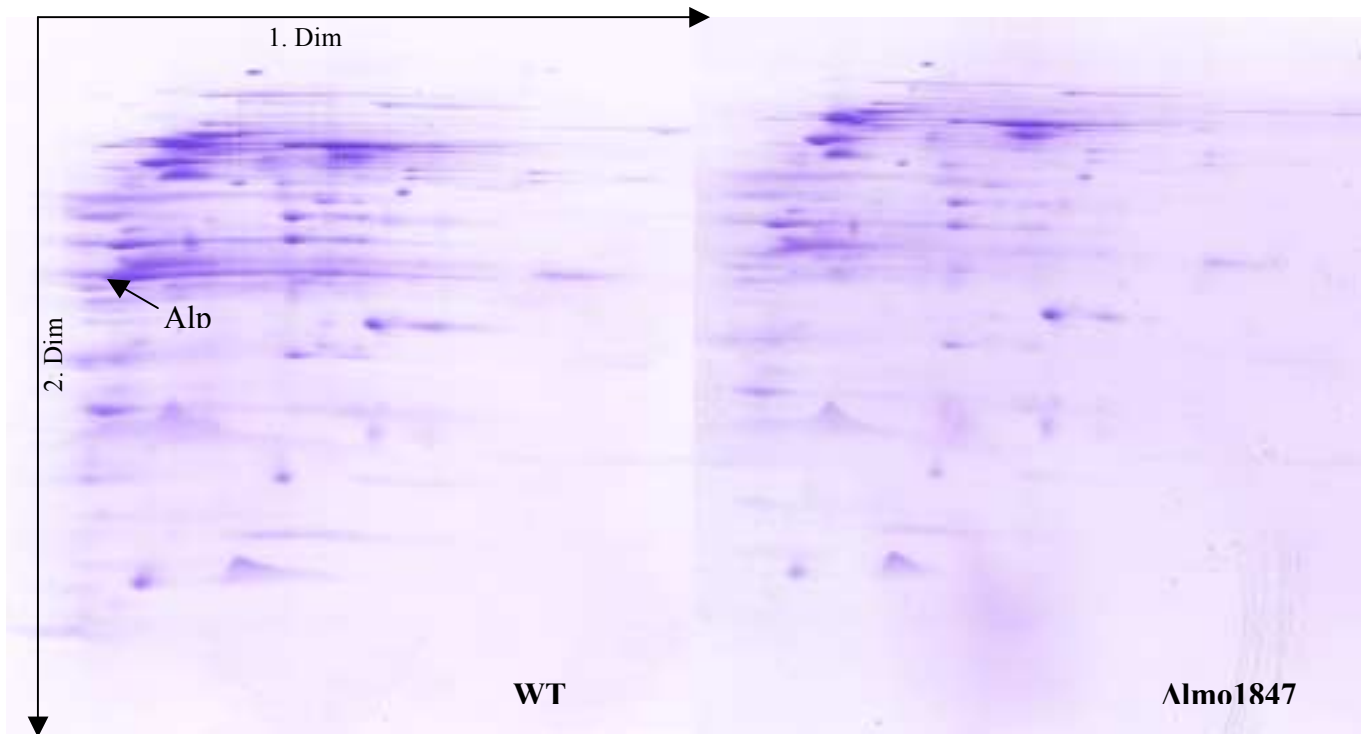


Abbildung 3.30: Auftrennung von Membranproteinextrakten durch Blau Native Gelelektrophorese. Es wurden Membranextrakte des Wildtyps (WT) und der Alp-Deletionsmutante ($\Delta lmo1847$) von *L. monocytogenes* zur Identifikation von Proteinkomplexen eingesetzt. Das Protein Alp wurde per Mikrosequenzierung im Q-TOF identifiziert und ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Eingesetzt wurde eine Membranfraktion des Wildtyps und der Deletionsmutante $\Delta lmo1847$.

3.4.7. Klonierung, Expression und Aufreinigung von Alp

Um die Bindungseigenschaften an Metallionen und andere ABC-Transporterbestandteile sowie die Struktur von Alp genauer zu untersuchen, mußten größere Proteinmengen aufgereinigt werden. Aus 2-D Gelen der Oberflächenproteinextrakte erwies sich dieses als unmöglich, da mehrere Proteine mit einem sehr ähnlichen isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht im Bereich des Alp-Spots zu finden waren. Diese wären auch wahrscheinlich wegen ihrer ähnlichen Eigenschaften nicht durch chromatographische Methoden abzutrennen gewesen. Außerdem sollte in Kristallisationsexperimenten die Struktur des Alps aufgeklärt werden, wofür ebenfalls große Mengen an reinem Protein notwendig sind. Daher wurde der Genabschnitt von Alp durch PCR aus genomischer DNA von *L. monocytogenes* mit Oligonukleotiden amplifiziert. In verschiedenen Ansätzen wurde das Gen *alp* (*lmo1847*) in Expressionsvektoren kloniert. Danach erfolgte die Expression und Aufreinigung.

3.4.7.1. *E. coli*-pGEX-Ansatz

Die Oligonukleotide „Alp SP BglII sense“ und „Alp EcoRI anti Stop“ wurden hierbei zur Amplifikation von *lmo1847* eingesetzt. Die PCR wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 37 °C durchgeführt. Die Klonierung des 955 bp großen Fragments in den TOPO-Vektor erfolgte mit dem TOPO TA Cloning® Kit. Dieser Konstrukt wurde in kompetente *E. coli* transformiert und durch Plasmid-Minipräparation isoliert. Durch eine Kontrollrestriktion und Sequenzierung wurden die positiven Klone herausgesucht. Aus den positiven Klonen wurde das *lmo1847*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen BglII und EcoRI in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 eingebaut und erst in *E. coli* Tg2 und dann in BL21 transformiert. Durch Zugabe von IPTG zu den BL21-Kulturen wurde die Expression des GST-Alp-Fusionsprotein induziert (Abbildung 3.31). Die Gesamtzellextrakte der Klone 111, 112, 511 und 512 zeigten eine deutlich stärkere Bande bei ca. 40 kD nach der Induktion. Allerdings wurde das GST-Fusionsprotein bei ca. 60 kD erwartet, da es sich aus den 26 kD des GSTs und 35 kD des Proteins Alp zusammensetzt.

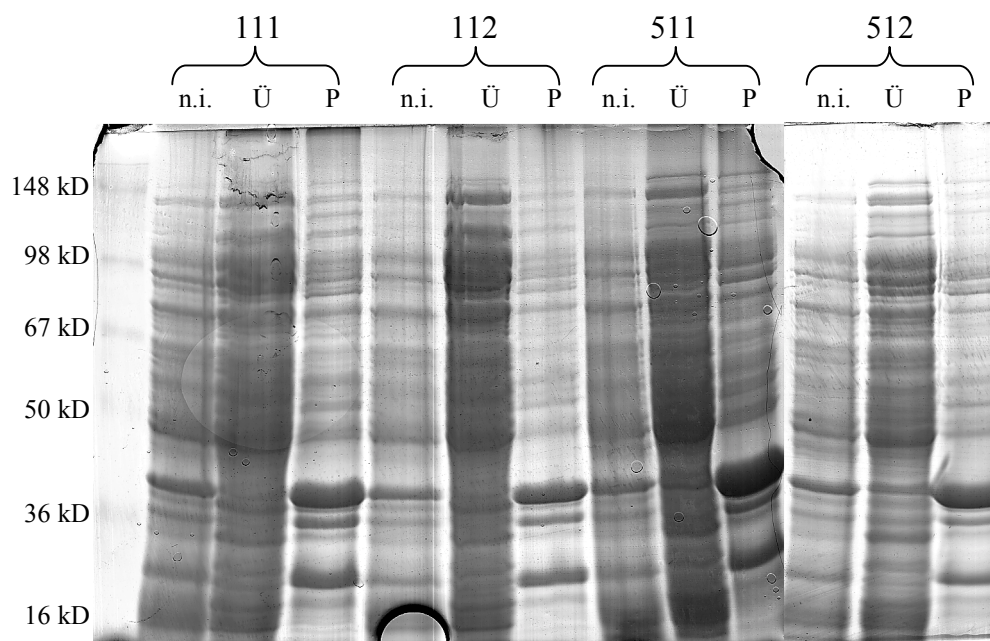


Abbildung 3.31: Expression von GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21. Die Klone 111, 112, 511 und 512 beinhalten den Expressionsvektor pGEX-6P-1 mit *lmo1847* aus *L. monocytogenes*. Auf das 10 % ige SDS-Gel wurden jeweils Bakterienzellextrakt vor der Induktion mit IPTG (n.i.), Kulturmedium nach Induktion (Ü) und Bakterienzellextrakt nach Induktion (P) aufgetragen.

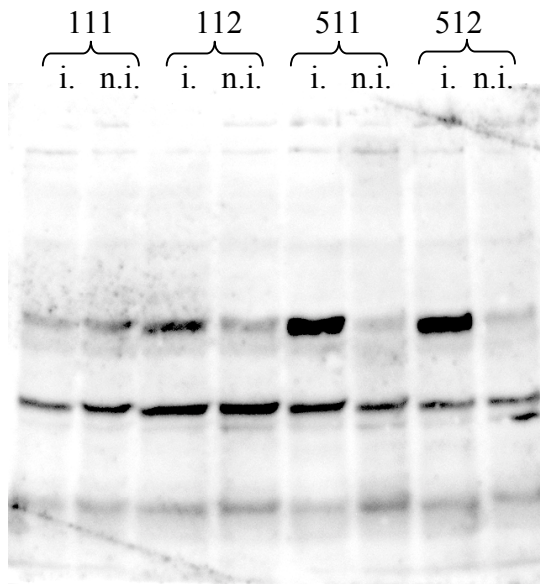


Abbildung 3.20: Westernblot der Alp-überproduzierenden Klone. Von *E. coli* BL21 mit dem pGEX-alp Konstrukt wurden Gesamtzellextrakte durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran gebロットet und mit dem polyklonalen Antikörper α Alp entwickelt. Damit wurde bei den mit IPTG induzierten Klonen (i.) im Vergleich zu den nicht induzierten Klonen (n.i.) eine zusätzliche Proteinbande bei 50 kD detektiert.

Im Westernblot konnte durch den polyklonalen Antikörper α alp2 eine weitere Bande bei 60 kD bei den induzierten Klonen detektiert werden (Abbildung 3.32). Diese erschien im Gesamtzellextrakt nur relativ schwach exprimiert.

Der Gesamtzellextrakt des Klons 111 wurde mit Glutathion-Sepharose inkubiert, um das GST-Fusionsprotein zu binden. Nach Abspaltung des GST durch eine spezifische Protease sollte das Alp freigesetzt werden. Im Westernblot ließ sich aber nur ein schwaches Signal beim Eluat der Glutathion-Sepharose mit α alp2 detektieren (Probe 3) wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist. Dieses Protein besaß außerdem das gleiche Molekulargewicht, wie das GST-Fusionsprotein (Probe 1), so dass eine Abspaltung des GST unwahrscheinlich war. Bestätigt wurde diese Vermutung durch das starke Signal der verwendeten Glutathion-Sepharose (Probe 4), die noch immer den größten Teil des Fusionsproteins, nachgewiesen durch α alp2, gebunden hatte. In einem anderen Ansatz wurde das GST-Fusionsprotein als Ganzes durch Glutathion von der Sepharose eluiert und anschließend in Lösung mit der Protease behandelt (Probe 10). Auch hierbei änderte sich das Molekulargewicht im Vergleich zum Gesamtzellextrakt (Probe 7) und der proteolytischen Elution (Probe 9) nicht. Kein Ansatz zeigte ein Produkt mit dem Molekulargewicht des Alps aus dem Tris-Extrakten (Probe 5) oder des GSTs (Probe 6). Eine Erklärung hierfür wäre durch Proteinkonformation eine nicht frei zugängliche Schnittstelle zwischen GST und Alp.

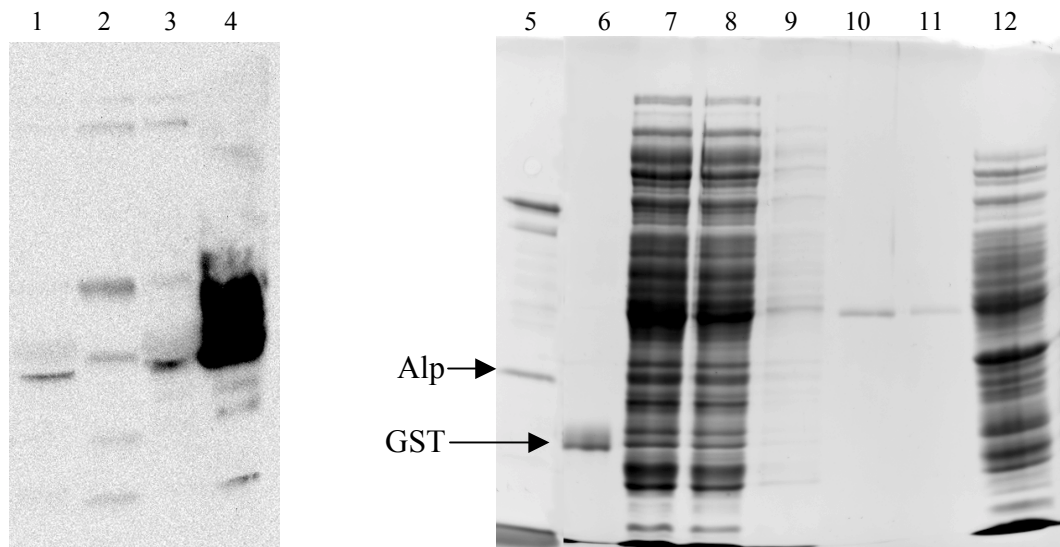


Abbildung 3.33: GST-Fusionsproteinaufreinigung des Klons 111. Im Westernblot links zu sehen ist der Gesamtzellextrakt (1), der Durchfluß dieses Extraktes nach der Kopplung an die Glutathion-Sepharose (2), das durch Protease von der Sepharose gespaltene Eluat (3) und die Sepharose nach der Aufreinigung (4). Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper α alp2. Das RuBPS gefärbte SDS-Gel rechts zeigt als Kontrolle einen Tris-Extrakt aus *L. monocytogenes* (5), der Alp enthält, aufgereinigtes GST (6), Gesamtzellextrakt des Klons vor (7) und nach (8) der Inkubation mit Glutathion-Sepharose, das Protease-Eluat (9), das Glutathion-Eluat nach Proteasebehandlung (10), die Sepharose (11) und den Gesamtzellextrakt des nicht-induzierten Klons.

Der Gesamtzellextrakt des Klon 512 wurde über Glutathion-Sepharose aufgereinigt und Alp sowohl durch die proteolytische Absplattung des gebundenen GST eluiert, als auch durch Glutathion als GST-Fusionsprotein. Hierbei konnten keine mit dem polyklonalen Antikörper α alp2 detektierbaren Mengen des Proteins gewonnen werden. In Abbildung 3.34 ist ein mit α alp2 entwickelter Westernblot zu sehen, bei dem als Negativkontrolle reines GST (1), als Positivkontrolle ein Tris-Extrakt von *L. monocytogenes* (2) aufgetragen wurde, sowie das eluierte Alp (3) und GST-Fusionsprotein (4), der Gesamtzellextrakt des Klon 512 vor (5) und nach (6) der Inkubation mit Sepharose.

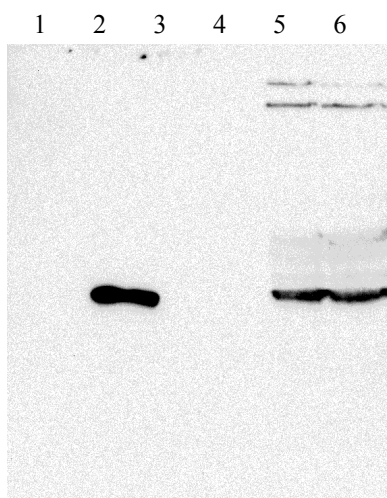


Abbildung 3.34: Westernblot der GST-Fusionsproteinaufreinigung des Klons 512. Aufgetragen wurde reines GST (1), ein Tris-Extrakt von *L. monocytogenes* (2), das von der Glutathion-Sepharose durch Protease eluierte Alp (3) und durch Glutathion eluierte GST-Fusionsprotein (4), der Gesamtzellextrakt des Klons vor (5) und nach (6) der Sepharose-Inkubation.

Dieses System zeigte Probleme durch vermutliche Degradationsprozesse und Konformationsänderungen des Alps. Eine Überexpression und Aufreinigung des Proteins mit Hilfe dieses Ansatzes war nicht möglich.

3.4.7.2. *E. coli*-Ansatz ohne TAG

Mit den Oligonukleotiden „Alp SP NdeI sense“ und „Alp EcoRI anti Stop“ wurde aus genomischer DNA von *L. monocytogenes* Wildtyp das Gen *lmo1847* bei 56 °C amplifiziert. Das 956 bp große Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning® Kit in den TOPO-Vektor kloniert und in kompetente *E.coli* transformiert. Die positiven Klone wurden über eine Kontrollrestriktion und Sequenzierung bestimmt und das *lmo1847*-Fragment über die Restriktionsschnittstellen NdeI und EcoRI in den Expressionsvektor PMW172 kloniert. Der Vektor PMW172 wurde von J. Victor Small in Salzburg hergestellt und enthält keinen TAG. Die präparierte Plasmid-DNA wurde erst in *E. coli* Tg2 und anschließend in BL21 transformiert. Die Expression in BL21 erfolgte durch Induktion mit IPTG. Im Gesamtzellextrakt des Klons 5 konnte eine deutliche Alp-Expression im Westernblot durch α alp2 detektiert werden. Der Gesamtzellextrakt des Klons 5 wurde anschließend über Q-Sepharose Fast Flow chromatografisch aufgetrennt. Die gesammelten Fraktionen wurden im SDS-Gel und Westernblot auf das Vorhandensein von Alp getestet (Abbildung 3.35).

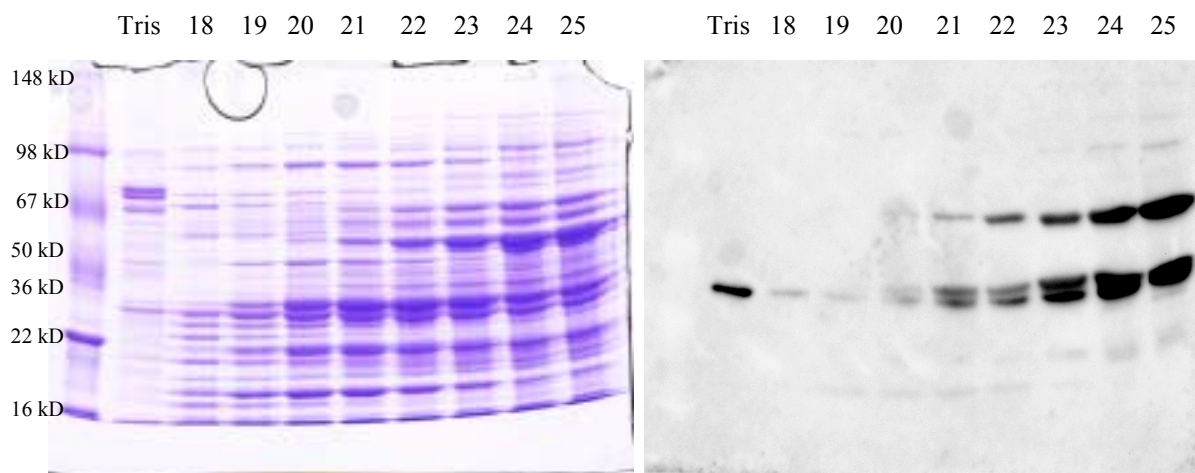


Abbildung 3.35: Alp-Expression und Aufreinigung in *E. coli* BL21 durch pMW172. Auf dem SDS-Gel (links) wurden die Fraktionen 18-25 aus dem Q-Sepharoselauf eines Gesamtzellextraktes des Klons 5 aufgetrennt und im Westernblot (rechts) durch den Antikörper α alp2 das Protein Alp detektiert. Als Positivkontrolle wurde ein Tris-Extrakt von *L. monocytogenes* aufgetragen (Tris).

Die Alp-enthaltenden Fraktionen 21-28 wurden vereinigt und für die weitere Auftrennungen durch Dialyse entsalzt. Hierbei fiel ein großer Teil der enthaltenen Proteine aus und war nachträglich nicht mehr in Lösung zu bekommen. Ein Detektion mit α alp2 (Abbildung 3.36) im Präzipitat (linke Bahn) und dem löslichen Rest (rechte Bahn) zeigte, dass auch das Protein Alp ausgefallen war. Eine Überexpression in diesem System war zwar möglich, eine Aufreinigung des Alps allerdings nicht.

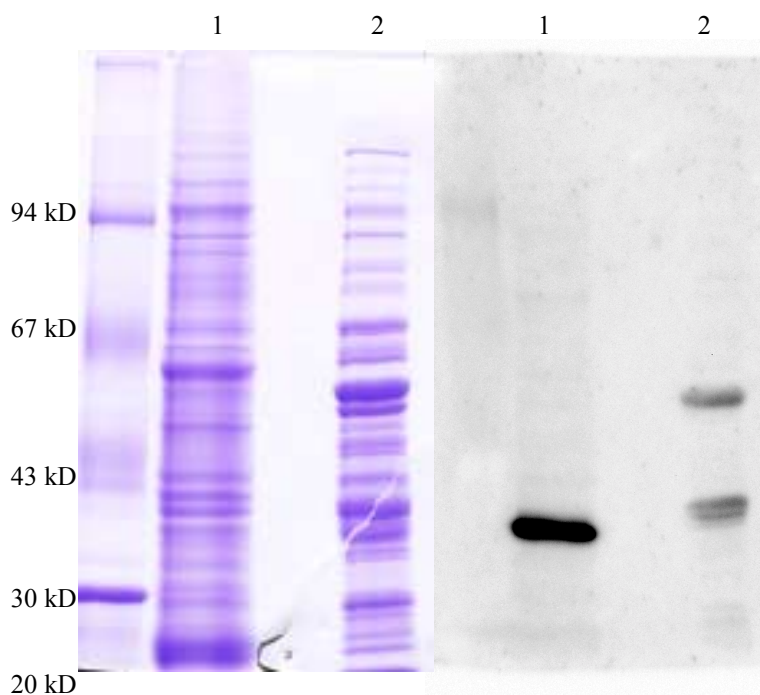


Abbildung 3.36: SDS-Gel und Westernblot der ausgefallenen und löslichen HPLC-Fractionen des Klon 5. Das 10 % ige SDS-Gel wurde Coomassie gefärbt und der Westernblot mit dem Antikörper α alp2 entwickelt. Zu sehen ist eine deutlich Alp-Bande in dem Präzipitat (1), drei schwache Banden im löslichen Teil der Fraktionen.

3.4.7.3 Listerien-His-TAG-Ansatz

Zur Amplifikation durch PCR von *alp* (*lmo1847*) wurden die Oligonukleotide „PalpNcoI“ und „AlpStopBglII“ bei einer Anlagerungstemperatur von 50 °C eingesetzt. Das entstandene 1285 bp lange Fragment enthielt zusätzlich die Promotorsequenz vor *lmo1847*, eine NcoI- und BglII-Restriktionsschnittstelle. Das Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen in den entsprechenden Vektor pMM kloniert und in *E. coli* Tg2 transformiert. Der Plasmidvektor pMM wurde von Matthias Machner in der GBF hergestellt und enthält eine Erythromycinresistenz, eine „multiple cloning site“ und kodiert am Ende der Klonierungsstelle für sechs Histine. Auf LB-Agarplatten mit Erythromycinzusatz (300 µg/ml)

wurden die positiven Klone selektiert und sequenziert. Die Klone mit den Plasmidkonstrukten, deren inserierte DNA-Sequenz mit der genomischen Sequenz übereinstimmte, wurden durch Elektroporation in kompetente *L.monocytogenes*-Zellen transformiert. Es konnten keine positiven Klone gefunden werden.

Eine effektive Elektroporation war bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich und konnte aus Zeitgründen nicht verbessert werden. Dennoch bietet dieser Ansatz die besten Möglichkeiten größere Mengen an reinem Alp zu erhalten. Die Expression erfolgt im ursprünglichen Organismus und sollte keine Probleme mit Degradation oder falsche Faltung zeigen. Außerdem kann die Aufreinigung spezifisch über einen „His-Tag“ stattfindet.

4. DISKUSSION

L. monocytogenes ist ein intrazellulärer human- und tierpathogener Erreger, bei dem die Oberflächenproteine eine wichtige Rolle für die Wechselwirkungen mit der Wirtszelle spielen. Als Gram-positives Bakterium besitzt *L. monocytogenes* eine Zellwand aus Peptidoglycan. Proteine können durch verschiedene Mechanismen mit der Zelloberfläche verknüpft oder assoziiert sein. Eine kovalente Bindung kann über das Peptidoglycan der Zellwand mit einem LPXTG-Motiv des Proteins entstehen. Nicht-kovalente Bindungen finden durch C-terminale hydrophobe Wechselwirkungen oder durch die Verankerung der Lipoproteine über Phospholipidreste in der Zytoplasmamembran statt. Außerdem können LysM-Domänen der P60-ähnlichen Proteine oder die Interaktionen der GW-Module einiger Proteine mit Lipoteichonsäuren eine nicht-kovalente Oberflächenassoziation bewirken. Anhand der Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGDe können insgesamt 133 Oberflächenproteine vorhergesagt werden (Glaser *et al.*, 2001). Ein Bruchteil dieser Oberflächenproteine wurde bisher identifiziert und genauer charakterisiert. Darunter befand sich auch die Proteinfamilie der Internaline, die essentielle Virulenzfaktoren beinhaltet (Dramsi *et al.*, 1995, 1997, Gaillard *et al.*, 1991, Raffelsbauer *et al.*, 1998). Ein weiterer gut charakterisierter Virulenzfaktor ist das Oberflächenprotein ActA, welches Aktinfilamente des Wirts polar an die Bakterienoberfläche rekrutiert (Kocks *et al.* 1995). Auch die Proteine Ami, Iap, Spl, TcsA, GbuC, QoxA und OpuCC wurden analysiert, wobei ihre genauen Funktionen bis heute nur teilweise bekannt sind (Cabanès *et al.*, 2001).

Eine zentrale Rolle bei der Regulation der bekannten Virulenzfaktoren spielt der Transkriptionsregulator PrfA, für den eine Promotor-Konsensussequenz bekannt ist (Sheehan *et al.*, 1995). Eine perfekte PrfA-Bindestelle findet sich vor den Genen *hly* und *plcA*, die für das Listeriolysin und die Phosphoinositol-spezifische Phospholipase C kodieren. Insgesamt finden sich 286 mögliche PrfA-Bindestellen mit maximal zwei abweichenden Basen in der Genomsequenz von *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001).

Weitere Hinweise auf mögliche Virulenzfaktoren bietet der Vergleich der Genomsequenzen von *L. monocytogenes* und dem apathogenen Stamm *L. innocua*, da 270 Gene spezifisch für *L. monocytogenes* sind.

Auf der Suche nach neuen Zellwand-assoziierten Proteinen, die eine Rolle im Infektionszyklus spielen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden entwickelt, um Oberflächenproteine zu isolieren und anzureichern. Mit Hilfe der ein- und

zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten diese Extrakte aufgetrennt und visualisiert werden. Dabei wurden auch Vergleiche des Wildtyps mit der *PrfA*-Deletionsmutante und einem PrfA konstitutiv überexprimierenden Stamm durchgeführt, um Hinweise auf eine PrfA-Regulation zu erhalten. Die Identifikation der einzelnen Proteine erfolgte durch N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Analysen. Hierbei konnten neben den bereits bekannten Virulenzfaktoren die Proteine AppA, TcsA und Alp als putativ prfA-reguliert identifiziert werden. Das Protein Alp und das Protein P70, welches durch Assoziation mit einem Virulenzfaktor auffiel, sollten hinsichtlich seiner Eigenschaften, Regulation, Funktion und Rolle bei der Virulenz von *L. monocytogenes* analysiert.

4.1. Methodenentwicklung

Um neue Zellwand-assoziierte Proteine als mögliche neue Virulenzfaktoren bei *L. monocytogenes* zu identifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl die serielle Extraktion als auch eine endolytische Protoplastierung etabliert. Mit Hilfe dieser Verfahren war es möglich, kovalent und nicht-kovalent gebundene Proteine der Gram-positiven Zellwand zu isolieren. Ziel einer seriellen Extraktionsmethode war ein schrittweises Herauslösen der Zellwandproteine unter stringenter werdenden Bedingungen ohne die Bakterienzelle zu lysieren, um so verschiedene Fraktionen bzw. definierte Subproteome zu erhalten, die sich mit guter Auflösung elektrophoretisch auftrennen lassen. Ausgangspunkt für die serielle Extraktion war die Möglichkeit der Anreicherung des Virulenzfaktors Internalin B durch Inkubation mit Tris-Puffer (Mueller *et al.* 1998). Nach dem ersten Schritt mit 1 M Tris pH 7.5 wurde eine Extraktion mit dem chaotropen Salz KSCN aus der Hofmeister-Reihe angeschlossen. Ein ähnliches Salz, nämlich LiCl, wurde bereits für die Extraktion einiger Oberflächenproteine von *Bacillus subtilis* verwendet (Foster 1992). Für die folgenden Solubilisierungsschritte wurden das zwitterionische Detergenz CHAPS, das nichtionische Detergenz Octylglucosid, sowie die Detergenzien CTAB und SDS als kationische und anionische Vertreter, ausgewählt.

Für die Isolierung einer möglichst vollständigen Zellwandfraktion aus *L. monocytogenes* wurde in der vorliegenden Arbeit eine weitere Methode etabliert. Dabei sollte die Zellwand und ihre Proteine durch eine enzymatische Protoplastierung gewonnen werden. In der

Literatur wurde hierfür bei Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* Lysozym (Merchante *et al.*, 1995) oder bei *Streptococcus sp.* Mutanolysin (Calandra *et al.*, 1980, Yother & White, 1994) eingesetzt. Für *L. monocytogenes* existiert ein etabliertes Protokoll zur Herstellung von Protoplasten durch ein Gemisch der Enzyme Mutanolysin, Lysozym und Ampicillin (Dr. Uwe Kärst, persönliche Mitteilung). Die Inkubationsdauer beträgt hierbei mindestens 1,25 Stunden und Schädigungen der Bakterienzellen sowie eine Veränderung des Proteoms durch die lange Behandlungsdauer sind wahrscheinlich. Die Grundlage für eine neue schnellere Methode bietet der *L. monocytogenes* spezifische Bakteriophage A511. Er bewirkt eine effiziente Lyse der Bakterienzellen. Ein Phagen kodiert für das Endolysin PLY511, welches eine N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase darstellt und Bindungen im Peptidoglycangerüst der Zellwand spaltet (Loessner *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde erstmals das aufgereinigte PLY511 zur Protoplastierung und Abtrennung der Zellwandfraktion eingesetzt. Unterstützend wurde Mutanolysin zugefügt, um die entstandenen großen Zellwandfragmente abzubauen. Eine Kontrolle der Methode wurde mit Hilfe von mikroskopischen Phasenkontrastaufnahmen durchgeführt. Das Phagenlysin kann allerdings die Zellen bei längerer Behandlung auch lysieren und somit die Zellwandfraktion durch zytoplasmatische Proteine verunreinigen. Die optimale Behandlungsdauer wurde mit 10 Minuten bestimmt. Zusätzlich wurde eine Kontrollmethode in der vorliegenden Arbeit etabliert, um eine mögliche Kontamination der Zellwandfraktion mit zytoplasmatischen Bestandteilen nach Protoplastierung zu detektieren. Hierfür sollte ein Test entwickelt werden, der die Aktivität eines zytoplasmatischen Enzyms nachweisen kann. Merchante und Kollegen untersuchten 1995 die Aktivität der Glyceraldehyd 3-Phosphatdehydrogenase und der Isocitrat-Dehydrogenase in verschiedenen Zellfraktionen von *Bacillus subtilis*. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Enzymtests jedoch nicht übernommen werden. Die glykolytischen Enzyme sollten grundsätzlich nicht für Tests verwendet werden, da sie in den seriellen Oberflächeproteinextrakten identifiziert wurden und eine gezielte Exponation dieser Proteine auf der Zelloberfläche nicht ausgeschlossen werden konnte. Der in der Literatur erwähnte Nachweis der Malatdehydrogenaseaktivität (Sanwal *et al.*, 1969, Bergmeyer & Bernt, 1974) schied ebenfalls aus, weil der Aktivitätsnachweis nicht bei zytoplasmatischen Gesamtzellextrakten aus *L. monocytogenes* funktionierte, die als Positivkontrolle verwendet wurden. Vesanto und Kollegen untersuchten 1994 die Aktivität einer zytoplasmatischen Amino-peptidase C (PepC) bei *Lactobacillus helveticus*. Der Nachweis beruht auf der Fähigkeit der PepC, para-Nitroanilide verschiedener Aminosäuren unter einer bei 405 nm messbaren Farbreaktion umzusetzen. PepC ist ein hochkonserviertes Protein, das auch in *L.*

monocytogenes vorkommt (Glaser *et al.*, 2001). Das Protokoll konnte erfolgreich für die in dieser Arbeit hergestellten Extrakte modifiziert werden. In den Zellwandisolaten durch Protoplastierung sowie den seriellen Oberflächenproteinextrakten konnte im Gegensatz zu Gesamtzelllysaten keine PepC-Aktivität, d.h. keine zytoplasmatische Verunreinigungen, nachgewiesen werden. Doch auch mit diesem Test lässt sich eine zytoplasmatische Verunreinigung nicht völlig ausschließen, da die Enzymaktivität nur bis zu einer bestimmten Konzentration der PepC (5 U/ml) nachweisbar ist. Eine schwache Expression dieses Enzyms oder schwache Kontamination ist nicht nachweisbar. Untersuchungen der zytoplasmatischen PepC in *Lactobacillus helveticus* zeigten eine zytoplasmatische Aktivität von 20 U/ml in Gesamtzellextrakten aus der stationären Wachstumsphase in Vollmedium (Vesanto *et al.* 1994).

4.2. Identifikation neuer Oberflächeproteine

Zur Identifikation neuer Oberflächenproteine von *L. monocytogenes*, wurde die serielle Extraktion Zellwand-assoziiierter Proteine durch verschiedene Puffer, Salze und Detergenzien eingesetzt. Eine Isolierung der möglichst vollständigen Zellwandfraktion wurde außerdem durch Protoplastierung mit dem aufgereinigten Phagenlysin PLY511 durchgeführt. Mit Hilfe der Massenspektrometrie und der annotierten Genomsequenz von *L. monocytogenes* konnte ein großer Teil der isolierten Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung identifiziert werden. In der Annotation des Genoms findet sich eine Kategorisierung der einzelnen Gene in Gruppen anhand ihrer nachgewiesenen oder über Homologien vermuteten Funktion. Diese Kategorien wurden für die vorliegende Arbeit übernommen. Die am häufigsten vertretende funktionelle Gruppe unter den identifizierten Proteinen stellt die Gruppe „Zellhülle und zellulären Prozesse“ (Kategorie 1) dar. Vor allem Zellwandproteine (Kat. 1.1) und Transport/Bindeproteine und Lipoproteine (Kat. 1.2) konnten während dieser Arbeit identifiziert werden, wie in Tabelle 4.1 zu sehen ist.

Die in der vorliegenden Arbeit aus den Oberflächenproteinextrakten identifizierten Proteine sind in Tabelle 8.1 (Anhang) noch einmal als Übersicht aufgelistet und konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden: erwartete und unerwartete Proteine.

Tabelle 4.1: Einteilung der proteinkodierenden Gene von *L. monocytogenes* in funktionelle Kategorien. Aufgelistet ist jeweils die Anzahl der Gene aus der gesamten DNA-Sequenz (theoret.) (Glaser *et al.* 2001, suppl.) und der in dieser Arbeit identifizierten Proteine (ident.)

	Funktionelle Kategorie	theoret.	ident.
1	Zellhülle und zelluläre Prozesse	620	24
1.1	Zellwand	72	5
1.2	Transport/Bindeproteine u. Lipoproteine	331	13
1.3	Sensoren (Signaltransduktion)	16	0
1.4	Membranbioenergetik	48	1
1.5	Mobilität und Chemotaxis	30	0
1.6	Proteinsekretion	15	1
1.7	Zellteilung	23	1
1.8	Zelloberflächenproteine	63	3
1.9	Lösliche Internaline	4	0
1.10	Transformation/Kompetenz	18	0
2	Intermediärstoffwechsel	615	20
2.1	Kohlenhydratstoffwechsel u.ä.	252	14
2.1.1	Spezielle Reaktionswege	223	6
2.1.2	Glykolyse	25	7
2.1.3	Tricarbonsäurezyklus	4	0
2.2	Aminosäurestoffwechsel u.ä.	149	4
2.3	Nukleotid-und Nukleinsäurestoffwechsel	63	0
2.4	Lipidstoffwechsel	53	0
2.5	Stoffwechsel der Coenzyme u. prostethischen Gruppen	92	2
2.6	Phosphatstoffwechsel	6	0
3	Informationswege	468	9
3.1	DNA-Replikation	22	0
3.2	DNA-Restriktion/Modifikation und Reparatur	36	1
3.3	DNA-Rekombination	19	0
3.4	DNA-Packung und Segregation	14	0
3.5	RNA-Synthese	227	2
3.5.1	Initiation	5	0
3.5.2	Regulation	209	2
3.5.3	Elongation	9	0
3.5.4	Termination	4	0
3.6	RNA-Modifikation	25	0
3.7	Proteinsynthese	97	3
3.7.1	Ribosomale Proteine	56	0
3.7.2	Aminoacyl-tRNA-Synthasen	26	0
3.7.3	Initiation	5	0
3.7.4	Elongation	5	2
3.7.5	Termination	5	1
3.8	Proteinmodifikation	21	0
3.9	Proteinfaltung	7	3
4	Andere Funktionen	149	4
4.1	Adaptation an untypische Bedingungen	39	1
4.2	Detoxifikation	22	2

4.3	Phagen-verwandte Funktionen	49	0
4.4	Transposons und IS	23	1
4.5		16	0
5	Ähnlichkeiten zu unbekannten Proteinen	747	7
5.1	Bei <i>Listeria</i>	58	0
5.2	Bei anderen Organismen	689	7
6	Keine Ähnlichkeiten	261	3

Erwartete Proteine:

Ursprünglich war die serielle Extraktion zur Isolierung vor allem nicht-kovalent gebundener Proteine der Zellhülle gedacht. Vergleicht man die Annotation des Genoms mit den identifizierten Proteinen dieses Ansatzes, so konnten zwei von vier vorhergesagten P60-ähnlichen Proteinen sowie zwei von neun vorhergesagten GW-assoziierten Proteinen isoliert werden (Tabelle 4.2). Außerdem wurden mit dieser Methode auch 22 putative Lipoproteine identifiziert, die nicht-kovalent mit der Zellhülle verknüpft sind (Tabelle 4.2). Einige Lipoproteine wurden in der Tris-Fraktion der seriellen Extraktion, der überwiegende Teil in der KSCN-Fraktion gefunden. Die Proteine mit den anderen bekannten Oberflächen-assoziationsmechanismen wurden zumeist sowohl in der Tris- als auch in der KSCN-Extrakten identifiziert. Die folgenden Fraktionen der seriellen Extraktion wurden in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt, da zytoplasmatische Verunreinigungen durch Schädigungen der Zellen aufgrund der fortschreitenden Stringenz und Behandlungsdauer vermutet wurden. Die Anreicherung der kovalent gebundenen Proteine war das Ziel der zweiten Methode, der endolytischen Protoplastierung gewesen. In diesem Ansatz konnte nur ein Lipoprotein und keine Proteine mit P60-Ähnlichkeiten oder GW-Modulen identifiziert werden (Tabelle 4.2). Doch auch kovalent gebundene Proteine, wie die LPXTG-Proteine, konnten nicht identifiziert werden. Das einzige nachgewiesene LPXTG-Protein stammte dagegen aus den seriellen Extrakten (Tabelle 4.2). Gründe für die geringe Anzahl an identifizierten Proteinen mit einem LPXTG-Anker in allen Fraktionen können geringe Expression oder Probleme bei der Identifikation sein. Bei dem Verdau der Zellwand verbleiben Peptidoglycanreste an den LPXTG-Proteinen, die vor allem eine Auftrennung im ein-oder zweidimensionalen Gel erschweren. Dieses Problem ist auch bei Zellwandfraktionen von *Streptococcus* beschrieben (Navarre *et al.*, 1998, Osaki *et al.*, 2002) und erklärt die fehlenden Beispiele und Informationen dieser Proteingruppe in der Literatur. Bierne und Kollegen identifizierten auch über Schwierigkeiten nur drei LPXTG-Proteine aus Peptidoglycanextrakten von *L. monocytogenes*, darunter auch das hier identifizierte Lmo2714

(2002). Hauptproblem scheinen die geringe Expressionsraten dieser Proteine zu sein (Matthias Trost, persönliche Mitteilung).

Tabelle 4.2: Identifizierte Oberflächenproteine von *L. monocytogenes*: Vergleich der beiden Extraktionsmethoden zur Anreicherung bestimmter Oberflächenproteinklassen.

Oberflächeproteintyp	serielle Extraktion	endolytische Protoplastierung	putative Gene im Genom von <i>L. monocytogenes</i>
GW-Modul	2	0	9
P60-ähnliches Protein	2	0	4
hydrophober C-Terminus	1	0	11
Lipoprotein	22	1	68
LPXTG-Motiv	1	0	41
weitere	6	2	-

Interessanterweise konnten des Weiteren neben den bekannten Proteinen des Virulenzgenclusters vier Proteine identifiziert werden, die nicht in *L. innocua* vorkommen (Lmo0739, Lmo1068, Lmo1083 und Lmo2331). Drei von ihnen stellen putative Lipoproteine dar und werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Außerdem gelang zusätzlich zu den bereits bekannten Virulenzfaktoren die Identifikation von drei Proteinen, die eine putative PrfA-Box strangaufwärts ihrer Gensequenz enthalten (Lmo1730, Lmo1847, Lmo2219). Ein identifiziertes Protein wies sowohl eine PrfA-Box auf als auch eine Abwesenheit in *L. innocua* (Lmo1082) auf. Ein Kandidat eines neuen Virulenzfaktors, das Protein Lmo1847 (Alp) wurde in der vorliegenden Arbeit genauer analysiert und charakterisiert.

In dieser Arbeit konnte durch die Identifikation von Lmo0904, Lmo1059 und Lmo1068 die Existenz von drei Proteinen der Kategorie 6 bestätigt werden. Diese Kategorie enthält hypothetische Proteine bzw. theoretische offene Leserahmen, für die bisher keine Homologien oder nachweisliche Genprodukte gefunden wurden. Außerdem wurden zehn weitere offenen Leserahmen durch das Identifizieren ihrer Genprodukte in dieser Arbeit bestätigt. Sie kodieren für hypothetische Proteine, für die homologe Sequenzen in den Genomen anderer Organismen gefunden wurden (Kategorie 5). Insgesamt wurden sechs Proteine identifiziert, für die eine Signalsequenz vorhergesagt ist, deren Oberflächenassoziation allerdings unbekannt ist (Tabelle 4.2). D.h. in der Annotation des Genoms werden sie weder den sekretorischen Proteinen noch den bekannten Klassen der Oberflächenproteine zugeordnet (Lmo0443, Lmo0950, Lmo1059, Lmo1082, Lmo1082, Lmo2691). Zumindest für ein Protein (Lmo2691) konnte die Signalsequenz durch N-terminale Sequenzierung bestätigt

werden und bei Sequenzanalysen LysM-Domänen für eine mögliche Oberflächenassoziation gefunden werden.

Zur Isolierung neuer eventueller Virulenzfaktoren bei *L. monocytogenes* erwies sich vor allem die serielle Extraktion als besonders geeignet, da hiermit vor allem putative Lipoproteine und über GW-Module an die Zellwand assoziierte Proteine angereichert und identifiziert werden konnten. Für die Isolierung und Anreicherung von möglichen LPXTG-Proteine oder Proteinen, die mit einem hydrophoben C-Terminus mit der Zellhülle assoziiert sind, müssen weiterführend neue Methoden etabliert werden.

Nicht erwartete Proteine:

Insgesamt fanden sich unter den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteinen 39, die keine vorhersagbare Signalsequenz besaßen (siehe Tabelle 8.1 im Anhang), d.h. es ist bisher kein Sekretionsmechanismus bekannt, der diese Proteine aus der Zelle transportiert. Diesen Proteinen wird außerdem eine Funktion im Zytoplasma der Bakterienzelle zugeordnet. Doch in einigen Fällen wird für diese eigentlich typisch zytoplasmatischen Proteine eine zusätzliche Funktion außerhalb der Zelle diskutiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden auch bei anderen Gram-positiven Bakterien zytoplasmatische Proteine in Oberflächenproteinextrakten identifiziert und teilweise auch eine Lokalisation auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Bei *Mycobacterium tuberculosis* beispielsweise wurden die Elongationsfaktoren TU (Tuf) und TS (Fus), die Pyruvatdehydrogenase-Untereinheit PdhB, die Superoxiddismutase (SodA), die Chaperone GroEL, GroES und DnaK als starke Antigene des Tuberkuloseerregers identifiziert und eine gezielte Expression auf der Bakterienoberfläche angenommen (Rosenkrands *et al.*, 2000, Vytvytsko *et al.*, 2002). Diese Proteine wurden ebenfalls in den Zellwandfraktionen der vorliegenden Arbeit bei *L. monocytogenes* als prominente Proteinspots in 2D-Gelen identifiziert. Auch bei Streptokokken wurden typische zytoplasmatische Proteine wie z.B. die Enolase, Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase und das Chaperonin GroEL in Oberflächenproteinextrakten identifiziert (Pancholi & Fischetti, 1992, Bergmann *et al.*, 2001). Für einige diese Proteine sind zusätzliche Funktionen außerhalb der Zelle bekannt. Die Enolase beispielsweise wurde auf der Zelloberfläche von A-Streptokokken und *Streptococcus pneumoniae* mit Plasminogen-bindenden Eigenschaften nachgewiesen (Pancholi *et al.*, 1998, Bergmann *et al.*, 2001). Humanes Plasminogen baut nach dessen Aktivierung Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und Kollagen ab. Die Bakterien

könnten durch eigene Oberflächenproteine die fibrinolytischen Prozesse des Wirts auslösen, um in das Wirtsgewebe einzudringen. Bei *Staphylococcus aureus* wurde ein Zellwandprotein identifiziert, dass große Homologie zu Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase besitzt und an humanes Transferrin bindet (Modun *et al.*, 1999). Transferrin bindet beim Menschen freie Eisenionen in Körperflüssigkeiten. Eine Bindung der Bakterien an Transferrin könnte eine Rolle bei der Rekrutierung des Eisens spielen, welches als Cofaktor lebensnotwendig für die Bakterien im Wirt ist. Weitere glykolytische Enzyme wie die Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase wurden bei Streptokokken (Pancholi *et al.*, 1992, Lottenberg *et al.*, 1992) und die 3-Phosphoglyceratkinase bei *Candida albicans* (Alloush *et al.*, 1997) Zellwand-assoziiert gefunden. Pathogene Bakterien benötigen eine Vielzahl von Oberflächenproteinen, um in Kontakt mit dem Wirtsorganismus zu treten. Eine Rolle hierbei von typischen zytoplasmatischen Proteinen durch zusätzliche Funktionen und Eigenschaften erscheint möglich, da es eine effiziente Nutzung der vorhandenen Gene bzw. Genprodukte darstellt und die „Ein-Gen-Eine-Funktion“-Hypothese durch zahlreiche Beispiele widerlegt wurde (Jeffrey, 1998). Auch für *L. monocytogenes* sind diese so genannten „schwarzarbeitenden“ Proteine denkbar, da dieses Bakterium über einen sehr komplexen Infektionszyklus und verschiedene Wege der Adhärenz und Internalisierung für verschiedene Wirtszelltypen verfügt. Ein tatsächliches Vorkommen der zytoplasmatischen Proteine auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* ist durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wahrscheinlich. Die meisten Proteine ohne vorhergesagtes Signalpeptid wurden übereinstimmend in allen Oberflächenproteinextrakten vorgefunden. Da die serielle Extraktion und die endolytische Protoplastierung völlig verschiedene Strategien darstellen und trotzdem das gleiche Ergebnis in Übereinstimmung mit anderen Ansätzen von anderen Arbeitsgruppen liefern, ist eine Oberflächenexpression vorstellbar. Eine Kontamination der Proteinfractionen durch Zelllyse während der beiden Isolations-Methoden ist unwahrscheinlich. Die Mengen bzw. Volumina der Proteinspots oder -banden der eigentlich zytoplasmatischen Proteine in den aufgetrennten Extrakten sind teilweise sehr groß. Bei einer Kontamination der Extrakte durch Zelllyse wären geringere Proteinmengen oder auch weitere Enzyme des Zytosols zu erwarten gewesen. Eine sehr starke Zelllyse während der Extraktion konnte außerdem durch den PepC-Test und die mikroskopischen Kontrollen ausgeschlossen werden.

Während das Auftreten dieser Proteine an der Bakterienoberfläche reproduzierbar ist, bleibt die Frage nach dem Zweck bzw. der Funktion dort offen. Wechselwirkungen mit Wirtszellfaktoren konnten wie oben erwähnt für einige Proteine gezeigt werden. Allerdings fehlt ein Nachweis für die Bedeutung dieser Eigenschaften während der Infektionsprozesse.

Eine Affinität zwischen Proteinen, die eine Assoziation der zytoplasmatischen Proteine mit der Bakterienoberfläche und auch eine Interaktion mit bestimmten Wirtszellproteinen ermöglicht, kann auch eine zufällige Begebenheit sein, die keine weitere Interpretationen erlaubt. Ein wichtiger Ansatz für einen Nachweis der infektionbiologischen Bedeutung wäre die Aufklärung eines zielgerichteten Sekretionsmechanismus der Bakterien für diese Proteine. Ein Transportweg der zytoplasmatischen Enzyme aus der Bakterienzelle ist bisher unbekannt. Eine Möglichkeit, sie aus der Zelle zu schleusen wären unspezifische Peptidtransporter (Kuchler *et al.* 1993). Auch ein Transport über mechanosensitive Kanäle (Sukharev *et al.*, 1997), mit denen Zellen großen osmotischen Änderungen in ihrem umgebenden Milieu durch relativ unspezifische Sekretion von Moleküle entgegen, wird diskutiert. Als weitere Erklärung wird über das Freisetzen der zytoplasmatischen Proteine durch abgestorbene, lysierte Zellen und eine anschließende Reassoziaton bestimmter Proteine an die Oberfläche lebender Zellen spekuliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden übereinstimmend mit anderen Publikationen diverse eigentlich zytoplasmatische Proteine in Oberflächenproteinextrakten identifiziert. Neun dieser Proteine waren sogar in beiden Oberflächenfraktionen, die mit verschiedene Methoden generiert wurden, zu finden. Um eine zweckgerichtete Lokalisation der eigentlich zytoplasmatischen Proteine auf der Zelloberfläche bei *L. monocytogenes* und den anderen erwähnten Erregern zu bestätigen, sind weitere umfassende Analysen notwendig. Dabei müssen nicht nur die bisher unbekannten Sekretionswege untersucht werden, sondern auch neue Untersuchungsmethoden der infektionsbiologischen Rolle *in vivo* zur Bestätigung vermuteter zusätzlicher Funktionen verwendet.

In Abbildung 4.1 ist eine Karte des theoretischen Proteoms von *L. monocytogenes* gezeigt. Sie gibt einen Überblick über alle annotierten Gene der Genomsequenz von *L. monocytogenes*. Die Anordnung erfolgte anhand ihrer in der Datenbank angegebenen theoretischen Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte. Die Abbildung 4.1 stellt sozusagen ein virtuelles 2D-Gel dar und bestätigt die Auswahl der immobilisiert pH-Gradienten von 4-7. In diesem Bereich befinden sich theoretisch die größte Anzahl der Listerien-Proteine. Außerdem wird der Vorteil der eindimensionalen Gele gegenüber 2D-Gele sichtbar. Zwar erfolgt eine schlechtere Auftrennung, aber es konnten über diese Methode Proteine mit einem stark basischen isoelektrischen Punkt (pI) um und über 10 identifiziert werden. Die beiden über GW-Module assoziierten Proteine InlB (pI 10,11; 71,1 kD) und Ami (pI 10,05; 102,3 kD) konnten nur in den 1D-Gele als scharfe Banden identifiziert werden. Gleiches gilt für das

P60-ähnliche Proteine lap mit einem pI von 9,88 und das Protein Lmo2691 mit einem pI von 10,30. In diesem basischen pH-Bereich liegt die Schwachstelle der immobilisierten pH-Gradienten.

In der Abbildung 4.1 sind alle in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine aus Zellwand-assoziierten Extrakten bzw. Fraktionen farbig markiert. Anhand ihrer vorhergesagten Funktion und Sequenzeigenschaften wurden die zytoplasmatischen Proteine gelb angefärbt, Oberflächenproteine je nach ihrer Assoziation oder Verankerung rot, grün und blau.

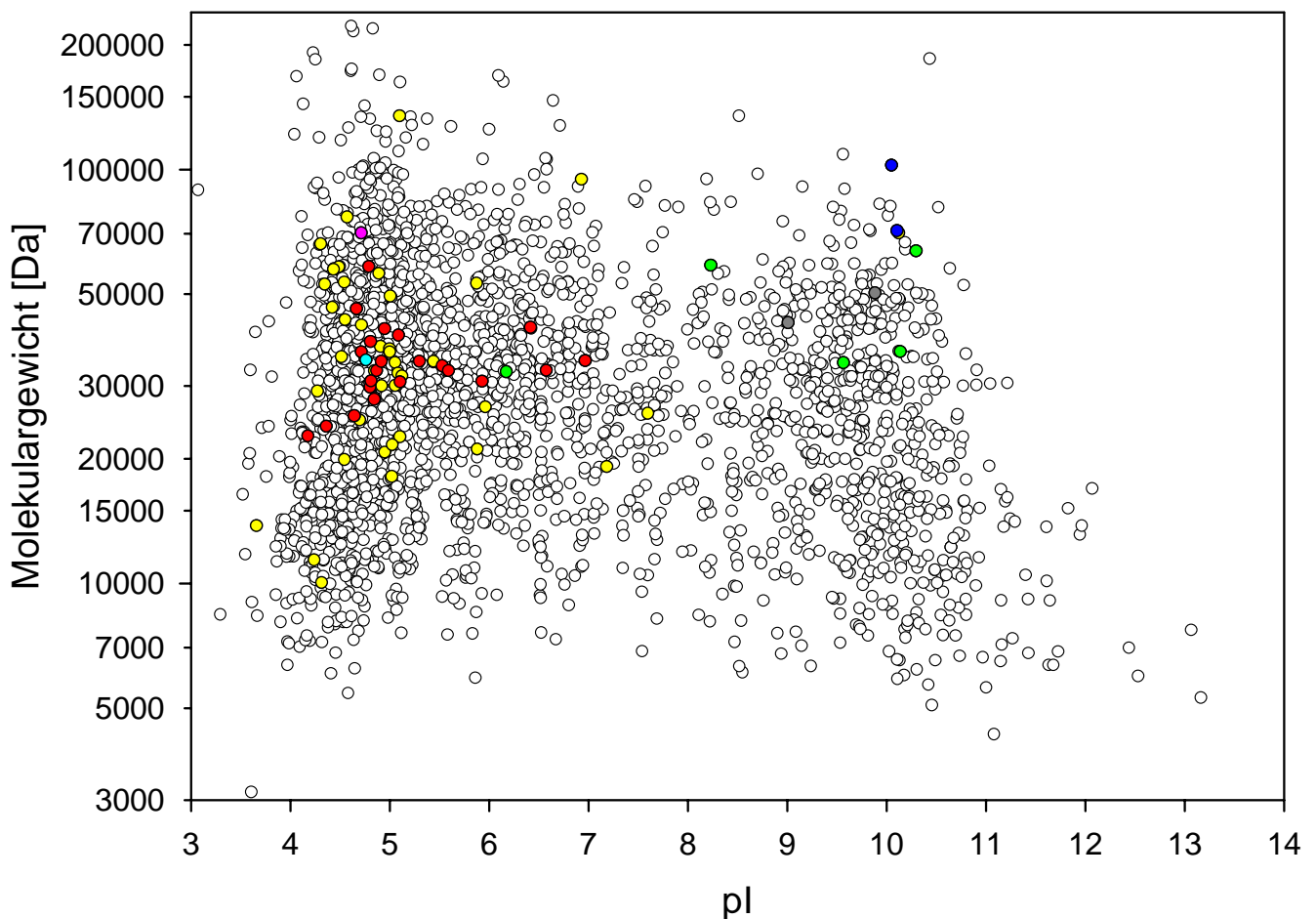


Abbildung 4.1: Theoretisches Proteom von *L. monocytogenes*. Farbig markiert sind alle in dieser Arbeit identifizierten Proteine: Lipoproteine sind in rot, Proteine mit GW-Modulen in blau, Proteine mit LPXTG-Motiv in türkis, P60-ähnliche Proteine in grau, Proteine mit hydrophoben C-terminalem Anker in rosa, die restlichen Proteine mit Signalsequenz in grün und die zytoplasmatischen Proteine in gelb dargestellt.

Eine weitere Besonderheit unter den identifizierten Proteinen aus Oberflächenproteinextrakten stellten die fehlenden Methionine am N-Terminus dar (siehe Tabelle 3.1). Der N-Terminus eines Proteins bestimmt dessen Halbwertszeit *in vivo* und ist wichtig für die Degradationsvorgänge und das proteolytische System in der Zelle. Anhand der „N-end rule“ erfolgt eine Einteilung in destabilisierende und stabilisierende Aminosäuren, die für *S. cerevisiae* (Bachmair *et al.*, 1986) und *E. coli* (Tobias *et al.*, 1991) genauer untersucht wurde. Unter den in dieser Arbeit N-terminal ansequenzierten Proteinen wurden zwei Proteine mit vorhandenem Methionin, 12 Proteine mit abgespaltenem Methionin und sieben Proteine mit abgespaltener Signalsequenz gefunden. Alle N-terminalen Aminosäuren stimmten mit der für *E. coli* etablierten „N-end rule“ überein und besaßen keine destabilisierenden Aminosäuren wie Tyrosin (Y), Tryptophan (W), Phenylalanin (F), Leucin (L), Lysin (K) oder Arginin (R). Beispielweise stimmte auch die Prozessierung des Initiator-Methionins bei den listeriellen Proteinen Phosphoglyceratkinase (Lmo2458), Enolase (Lmo2455), DnaK (Lmo1437) und Glyceraldehyd-3 Phosphatdehydrogenase (Lmo2459) und dem Translationselongationsfaktor G (Lmo2654) mit den homologen Vertretern bei *E. coli* überein. Bei den Proteinen mit Signalsequenz stimmten die Spaltungstellen für die Signalpeptidase nur bei drei Proteinen (Lmo0582, Lmo2558 und Lmo2691) mit der durch SignalP (www.expasy.ch) vorhersagbaren überein.

4.3. P70

Ein in Oberflächenproteinextrakten nach Tris-Behandlung bei *L. monocytogenes* stark exprimiertes ca. 67 kD großes Protein, das scheinbar mit dem Virulenzfaktor Internalin B assoziiert, wurde durch Edman-Abbau als *Lmo2691* identifiziert. Die beiden Proteine waren auch in der Doktorarbeit von Simone Müller nicht durch herkömmliche biochemische Verfahren trennbar. Das 590 Aminosäuren lange Protein zeigte eine Signalsequenz von 52 Aminosäuren, eine Amidase-Domäne und 4 sich wiederholende LysM-Domänen. Das Protein ist homolog zu bekannten Autolysinen und Muramidasen anderer Gram-positiver Bakterien. Es konnten jedoch keine weiteren Hinweise auf eine Rolle in der Virulenz von *L. monocytogenes* oder eine PrfA-Regulation durch bekannte Promotor-Konsensussequenzen gefunden werden. In der Kooperationsarbeitsgruppe von Prof. Trinad Chakraborty aus Giessen wurden eine Deletionsmutante *Δlmo2691* und eine komplementierte Deletionsmutante analysiert. Die

Mutante wuchs in Ketten, da eine vollständige Separation der Zellwand nicht mehr möglich war und zeigte sich stark attenuiert im Maus-Infektionsmodell (Chakraborty, persönliche Mitteilung). Außerdem wurde bereits von Dr. Michael Johnson aus Fayetteville, Arkansas, ein 66 kD großes speziesspezifisches Antigen bei *L. monocytogenes* publiziert (Nannapaneni *et al.*, 1998). Durch einen Austausch der Antikörper aus den USA und den in dieser Arbeit hergestellten konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei auch um das P70 bzw. Lmo2691 handelte und beide monoklonalen Antikörper kreuzreagierten. Allerdings wurde mittlerweile das Protein auch in einigen apathogenen *L. innocua*-Stämmen gefunden und scheidet daher als Grundlage für eindeutige diagnostische Zwecke aus (Chakraborty, persönliche Mitteilung).

4.4. Alp

Ein 36 kD Protein wurde in Oberflächenextrakten von *L. monocytogenes* identifiziert, welches vermutlich PrfA-abhängig exprimiert wird. Ein erster Hinweis darauf ergab sich durch eine stärkere Proteinbande in eindimensionalen SDS-Gelen bei dem PrfA-überexprimierenden Stamm im Vergleich zum Wildtyp. Unterstützt wurde diese Vermutung nachdem das Protein identifiziert und die kodierende DNA-Sequenz *lmo1847* gefunden wurde. 293 bp strangaufwärts von *lmo1847* wurde eine Konsensus-Sequenz für eine PrfA-Bindestelle erkannt. Im Vergleich zu der perfekten PrfA-Bindestelle vor dem Gen *hly*, welches für den Virulenzfaktor Listeriolysin kodiert, wies diese zwei Abweichungen auf.

Konsensus	TTAACANNTGTTAA	
<i>hly</i>	TTAACATTTGTTAA	-182 bp
<i>actA</i>	TTAACATAAGTTAA	-198 bp
<i>mpl</i>	TTAACAAATGTTAG	-198 bp
<i>inlA</i>	ATAACATAAGTTAA	-444 bp
<i>prfA</i>	CTAACAAATGTTGT	- 77 bp
<i>lmo1847*</i>	TTAACACTTGTAAC	-293 bp

Abbildung 4.2: Vergleich bekannter PrfA-Promotoren mit dem putativen (*) PrfA-Promotor von *lmo1847*. Dahinter ist der Abstand zum Startcodon in Basenpaaren angegeben.

Die Variation von ein bis zwei Basen in dieser Konsensussequenz war bereits bei anderen PrfA-abhängigen Genloci wie *inlA* und *actA* gefunden worden (Sheehan *et al.*, 1995). Auch die Lage der PrfA-Bindestelle im Bereich vor den Startcodons entsprach bisher bestätigten Bindestellen mit 77 Basenpaaren bei *prfA* und 444 Basenpaaren strangaufwärts bei *inlA* (Abbildung 4.2). Außerdem konnte eine mögliche SigB-Bindestelle strangaufwärts des Genlocus *lmo1849*, welcher zusammen mit *lmo1848* und *lmo1847* eine Operonstruktur bildet, gefunden werden (Abbildung 4.3). SigB reguliert in *Bacillus subtilis* und anderen Gram-positiven Bakterien reguliert eine unspezifische multiple Stressantwort und ist vor allem in der stationären Phase aktiv. (Boylan *et al.*, 1993a, Boylan *et al.*, 1993b, Hecker *et al.*, 1996, Völker *et al.*, 1994). Bekannte Vertreter dieses Stressregulons sind vor allem Proteine zur Protektion von DNA, Membranen und Proteine gegen oxidative Schäden (Review Hecker *et al.*, 1998). Petersohn *et al.* veröffentlichten 1999 eine Konsensussequenz für SigB-Promotoren 5'GTTTAA-N12-15- GGG(A/T)A(A/T)3', die nicht weiter als 400 bp strangaufwärts des Startcodons liegen und nicht mehr als zwei Fehler ausweisen darf. Diese Konsensussequenz trifft für über 90 % der bestätigten SigB-Promotoren in *B. subtilis* zu. Gertz *et al.* fanden 1999 eine Übereinstimmung Konsensussequenz für das SigB-regulierte Gen *asp23* bei *Staphylococcus aureus*. Weiterhin nannten sie vier Basen in der Konsensussequenz, die für die Promotoraktivität essentiell sind (Gertz *et al.*, 2000). Die putative SigB-Bindestelle 5'GTGTAA-N14-GGAAAA 3' von *lmo1849* enthält zwei abweichende Basen (rot), die essentiellen Basen (fett) und liegt 37 bp strangaufwärts des Startcodons (Abbildung 4.3). Sie erfüllt damit alle genannten Konditionen für bislang bekannte Gene des SigB-Regulons.

<i>sigB</i>	<i>B. subtilis</i>	GTTTAA-N14-GGGTAT	-41 bp
<i>yvy</i>	<i>B. subtilis</i>	GTTTCA-N14-GGGTAA	-45 bp
<i>katE</i>	<i>B. subtilis</i>	GTTTAT-N14-GGGTAA	-41 bp
<i>opuE</i>	<i>B. subtilis</i>	GTTTCA-N14-GGGAAT	-134 bp
<i>clpP</i>	<i>B. subtilis</i>	GTTTGA-N15-GGGAAA	-111 bp
<i>gtAB</i>	<i>B. subtilis</i>	GTGTAA-N14-GGGTAA	-54 bp
<i>asp23</i>	<i>S. aureus</i>	GTTTAA-N14-GGGTAT	-103 bp
<i>sigB</i>	<i>L. monocytogenes</i>	GTTTTA-N14-GGGTAA	-37 bp
<i>lmo1849*</i>	<i>L. monocytogenes</i>	GTGTAA-N14-GGAAAA	-37 bp

Abbildung 4.3: Vergleich des SigB-Promotoren von *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mit dem SigB-Promotor von *L. monocytogenes* (*L. monocytogenes*) und der putativen (*) SigB-Bindestelle vor *lmo1849*. Dahinter ist der Abstand zum Startcodon in Basenpaaren (bp) angegeben. Der Vergleich bestätigter sigB-Bindestellen wurde von Fraser *et al.* (2000) übernommen

Das Vorkommen dieses weiteren Promotors vor dem *lmo1847*-Locus könnte eine PrfA-unabhängige Expression des ABC-Transporterkomplexes in der Deletionsmutante *ΔprfA* von *L. monocytogenes* erklären.

In der Genom-Sequenz des apathogenen Stamms *L. innocua* fand sich das orthologe Gen *lin1961*, welches ebenfalls mit zwei weiteren offenen Leserahmen *lin 1962* und *lin1963* in einem Operon organisiert ist. Strangaufwärts des Startcodons von *lin1961* konnte allerdings keine potentielle PrfA-Bindestelle gefunden werden. Übereinstimmend liegt 37 Basenpaare strangaufwärts vom ersten Gen des Operons, *lin1963*, wie in *L. monocytogenes lmo1849*, eine potentielle SigB-Bindestelle.

Bei den funktionellen Analysen mit Hilfe einer Alp-Deletionmutante konnten in Wachstums- sowie Infektionsversuchen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtypstamm gefunden werden. In Proteomanalysen konnte jedoch gezeigt werden, dass bestimmte Proteine in der Deletionsmutante stärker exprimiert werden. Einige hochregulierte Proteine (Lmo0541, Lmo1041, Lmo1738 und Lmo2431) wurden durch Homologien Funktionen als Eisen-, Molybdat- oder Aminosäure-bindender Teil weiterer ABC-Transporter zugeordnet (Listilist). Da die Spezifitäten noch nicht genau untersucht sind, ist eine Übernahme der Funktion des ausgeschalteten Alps gut denkbar.

Die am stärksten Homologien zu Alp aufweisenden Proteine aus der SWISSPROT-Datenbank sind das Endocarditis spezifische Antigen (Q47723) von *Enterococcus faecalis* und das substratbindende Lipoprotein eines Metall-ABC-Transporters (MTSA) von *Streptococcus gordonii* und *Streptococcus cristatus*. In *Streptococcus gordonii* konnte MTSA mit dem dazugehörigen ScaA-Operon als hochaffiner Manganionen-Transporter nachgewiesen werden (Kolenbrander *et al.*, 1998). Diskutiert wurde auch eine zusätzliche Funktion als Adhäsion, welches eine Rolle bei der Adhärenz von Streptococci an die extrazelluläre Matrix der Wirts spielt (Jenkinson *et al.*, 1992, 1994, Kolenbrander *et al.*, 1998). Bei den Untersuchungen des Lipoproteins eines ABC-Transporters Alp konnte eine Affinität zu einer Reihe zweiwertiger Metallionen wie Mangan, Zink und Nickel in dieser Arbeit nachgewiesen werden. In der Literatur findet man in vielen Fällen eine Spezifität der substratbindenden Lipoproteine für verschiedene Ionen. Zum Beispiel konnte für das PsaA von *Streptococcus pneumoniae in vivo* ein Transport von Mangan nachgewiesen werden, die Kristallstruktur zeigte aber eine aktive Bindestelle, die mit Zink assoziiert war (Dintilhac *et al.*, 1997, Lawrence *et al.*, 1998). Das Alp-ähnliche FimA aus *Streptococcus pneumoniae* besitzt eine hohe Affinität zu Mangan (Mn²⁺), ist aber auch spezifisch für dreiwertige Eisen (Oetjen *et al.*, 2002). Außerdem wird auch bei FimA eine zusätzliche Adhärenz zu Fibrin vermutet (Berry *et al.*, 1996). Für

das Lipoprotein Lmb von *Streptococcus agalactiae* wurde bereits durch eine Deletionsmutante eine Rolle bei der Adhärenz zu humanem Laminin nachgewiesen (Spellerberg *et al.*, 1999).

Die Verbindung zwischen Metallionentransporter und der Virulenz wird deutlich, wenn man einen Blick auf die bereits umfassender charakterisierten Regulons bei *Bacillus subtilis* oder *Corynebacterium diphtheria* wirft. DtxR von *C. diphtheria* bindet Eisen und reprimiert so den Eisentransports sowie die Expression des Diphtherietoxins (Schmitt *et al.*, 1991, 1993, Tao *et al.*, 1992). Es besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne, einer zentralen Metallionen-Bindestelle und einer C-terminalen SH3-ähnlichen Domäne. Das Protein MntR aus *B. subtilis* besitzt Homologie zu DtxR, allerdings fehlt die SH3-ähnliche Domäne. MntR ist ein Mangan-abhängiger Repressor des Mangantransports, der das ABC-Transporter-Operon MntABCD reguliert (Que *et al.*, 2000). Mangan spielt in Bacilli eine wichtige Rolle bei der Sporulation (Charney 1951). Sowohl die MntR- als auch die MntA-Deletionmutante verlieren ihre Sporulationseigenschaft (Que *et al.*, 2000). MntA zeigt ebenfalls Homologien zu Alp von *L. monocytogenes*. Auch bei *L. monocytogenes* sind Zusammenhänge zwischen Metallionen und Virulenz bekannt. Unter den Virulenzfaktoren befinden sich zwei Zink-abhängige Proteine: die Metalloprotease Mpl und die Lecithinase PlcB (Geoffroy *et al.* 1991, Goldfine *et al.*, 1992, Poyart *et al.*, 1993).

Es ist wahrscheinlich, dass auch in *L. monocytogenes* der Metallionen-Transport mit der Virulenz des Bakteriums eng verknüpft ist. Das Protein Alp ist Bestandteil eines ABC-Transporters für zweiwertige Metallionen, dessen Funktion bei der Infektion über die *in vitro* Analysen dieser Arbeit hinaus weiterführend *in vivo* charakterisiert werden muss. Möglicherweise spielt das Metallionen-bindene Lipoprotein Alp auch eine Rolle in der Wirtsadhärenz. Somit könnte dem Protein Alp eine zusätzliche infektionsbiologische Bedeutung zukommen.

4.5. Funktionelle Genomanalyse durch Proteomforschung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation neuer Oberflächenproteine bei *L. monocytogenes*. Aus diesen Proteinen sollten mögliche Virulenzfaktoren ausgewählt und näher charakterisiert werden. Sowohl das Identifizieren als auch das Charakterisieren findet auf Proteinebene statt. Nur auf dieser Ebene, dem Proteom, können Aussagen über die Expression, die Lokalisation, posttranslationale Modifikation und die Syntheserate eines Proteins getroffen werden. Diese

Informationen sind essentiell, um Interaktionspartner, Regulationsmechanismen und Funktionen zu bestimmen.

Als Basis für die vorliegende Arbeit wurden die grundlegenden Techniken der Proteomanalyse gewählt: die zweidimensionale Gelelektrophorese und die Massenspektrometrie. Vor allem die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese wird wegen ihrer Vor- und Nachteile, ihrem Nutzen und ihrer Probleme häufig diskutiert und als Werkzeug in Frage gestellt. Ein Nachteil der 2D-Technik ist die aufwendige und zeitintensive Durchführung, für die außerdem eine gewisse Erfahrung und Übung notwendig ist. Die Reproduzierbarkeit der aufgetrennten Proteinmuster wurde durch kommerziell erhältliche immobilisierte pH-Gradienten stark verbessert, ist aber trotzdem nicht vollkommen zufrieden stellend. Ein weiteres Problem ist die schlechte Auftrennung der hydrophoben Proteine, wie etwa integrale Membranproteine, und die schlechte Auflösung im basischen Bereich. Außerdem sind Proteine, die in geringen Mengen exprimiert werden, schwer detektierbar.

Trotz all dieser negativen Aspekte wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese als beste Methode zur hochauflösenden Darstellung der Oberflächeproteingemische ausgewählt. Stark hydrophobe Proteine, sowie Proteine mit stark basischem isoelektrischen Punkt spielen in den gewählten Fraktionen keine bedeutende Rolle. Eine große Anzahl von Proteinen lies sich durch die 2D-Technik problemlos auftrennen und anschließend visualisieren und identifizieren. Dadurch war eine Katalogisierung der Genprodukte dieser Subproteome und eine Bestätigung vieler offener Leserahmen der Genomsequenz möglich. Außerdem konnten durch die 2D-Gele zusätzliche Informationen über die Proteine erhalten werden. Dazu zählten die biochemischen Eigenschaften wie Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt, sowie interessante Hinweise auf mögliche Prozessierung, die besonders mit dieser Methode möglich sind.

Bei einigen differentiellen Analysen wurden allerdings die Limitationen der 2D-Methode deutlich. Bei den Vergleichen der *prfA*-Mutanten zur Identifikation putativ PrfA-regulierter Proteine zeigte sich die mangelnde Reproduzierbarkeit. Einige Proteinspots schienen mal hoch- mal hinunterreguliert oder waren nur in einigen Ansätzen überhaupt detektierbar. Z. B. konnten die bekannten *prfA*-regulierten Virulenzfaktoren Internalin B und ActA, die als interne Kontrolle dienten, nur in einigen 2D-Gelen identifizieren werden. Die vermuteten Probleme durch schlechte Solubilisierbarkeit und schlechte Auftrennung werden durch die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung, während der 2D-Methode verursacht. Daher wurde für die Quantifizierung der differentiellen Genexpression und Identifikation putativ PrfA-regulierter Proteine auf die eindimensionale Gelelektrophorese zurückgegriffen.

Trotz verminderter Auflösung war das Proteinmuster hier besser reproduzierbar und die Kontrollproteine konnten stets detektiert werden. Für die differentiellen Analysen beim Vergleich der Proteinexpression beim *L. monocytogenes* Wildtyp und der Alp-Deletionsmutante konnten wiederum zweidimensionale Gele verwendet werden. Hier konnten die im Ergebnisteil aufgelisteten Proteinspots und ihre quantifizierten Unterschiede in drei unabhängigen Ansätzen reproduziert werden. Ein Grund hierfür waren andere Kontrollproteine. Außerdem löst die Deletion eines globalen Regulators wie PrfA sicher größere, viel komplexere Veränderungen im Proteom aus, die eine Reproduktion zusätzlich erschweren, als die Deletion eines ABC-Transporters, dessen Funktion zumindest teilweise kompensiert werden kann.

Eine Alternative zur zweidimensionalen Gelelektrophorese sind die „large-scale“ Peptid- und Proteintests (Emili *et al.* 2000), die allerdings für die Ziele dieser Arbeit aufgrund der notwendigen Antikörper zu aufwendig bzw. unmöglich waren. Eine gute Erweiterung der Ergebnisse könnte durch die Kapillar-Isoelektrische-Fokussierung oder eine trägerfreie Elektrophorese („free-flow“) erzielt werden. Hierbei könnten aus den Fraktionen gering exprimierte Proteine, niedermolekulare Proteine und Proteine mit stark basischem isoelektrischen Punkt angereichert und identifiziert werden (Shen *et al.*, 2000, Jensen *et al.*, 2000). Für Analysen differentieller Expression wird auch immer häufiger die ICAT (isotope coded affinity tag)-Methode als Ersatz für 2D-Gele eingesetzt (Gygi *et al.*, 1999). Hierbei werden in zwei verschiedenen Fraktionen Peptide mit schwerem bzw. leichtem Wasserstoff markiert, gemischt und später im Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrum (LC-MS) die Intensitäten verglichen. Allerdings erfolgt die Markierung über Cysteine, die in Lipoproteinen und LPXTG-Proteine sehr selten vorkommen und somit keine Ergänzung zu den gezeigten Ergebnissen ergeben konnten.

4.6 Ausblick

Zur Identifizierung weiterer Oberflächenproteine und putativer neuer Virulenzfaktoren müssten neue Methoden zur Anreicherung und Identifizierung gefunden werden. Vor allem die Proteine, die über ein LPXTG-Motif kovalent oder durch einen hydrophoben C-Terminus nicht-kovalent mit der Zellhülle verbunden sind, konnten mit den in dieser Arbeit gewählten Ansätzen nicht ausreichend charakterisiert werden. Ein interessanter Ansatz hierfür ist die aufwendige Herstellung einer hochreinen Peptidoglycanfraktion und die Identifikation aus

einem gellosen Ansatz mittels Elektrospray-Insisierung im Q-TOF-MS von Bierne und Kollegen (2002).

Die Vergleiche der verschiedenen prfA-Stämme durch Proteomanalysen ergaben neben den bekannten Virulenzfaktoren drei putativ PrfA-regulierte Proteine. Eines davon, Alp, wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Die beiden anderen TcsA und Appa bedürfen noch weiterer Analysen. Um die Ergebnisse zu bestätigen und zu erweitern, bietet sich eine ähnlicher Vergleich mit den Methoden der Transkriptionsforschung an. DNA-Chips von *L. monocytogenes* sind mittlerweile verfügbar und könnten weitere Einblicke in die PrfA-abhängige Expression geben. Des weiteren ist auch funktionelle Charakterisierung des putative PrfA-regulierten Proteins Alp noch nicht abgeschlossen. Die Aufreinigung des Proteins könnte Grundlage für weitere wichtige Analysen sein. Beispielsweise könnte eine Kristallisation erfolgen, die die Struktur des Proteins aufklärt. Außerdem könnte die Affinität der Metallionen zu dem aufgereinigten Protein besser bestimmt werden. In weiteren Bindungsexperimenten könnte die Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix untersucht werden, um neue Hinweise auf eine zusätzliche Rolle in der Infektionsbiologie von *L. monocytogenes* zu bekommen. Außerdem wurde in dieser Arbeit die Funktion nur *in vitro* untersucht. Analysen *in vivo* –beispielsweise im Mausmodell- müssen folgen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden Oberflächenproteine des fakultativ intrazellulären Erregers *L. monocytogenes* identifiziert und teilweise charakterisiert. Besonderes Augenmerk galt den Zellwand-assoziierten Proteinen, die eventuell eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Invasion im Infektionszyklus spielen könnten. Zur Anreicherung solcher Proteine wurden zwei verschiedene Verfahren entwickelt: die serielle Extraktion und die endolytische Protoplastierung. Bei der seriellen Extraktion wurden diverse Puffer, Salze und Detergenzien mit steigender Stringenz eingesetzt, um Zellwand-assoziierte Proteine zu solubilisieren. Durch die endolytische Protoplastierung mittels des Phagenlysins 511 sollte ein möglichst vollständiges Subproteom der Zellwand gewonnen werden. Ein Test wurde etabliert, um die Qualität der Fraktionen zu bestimmen und eine mögliche Verunreinigung durch Zelllyse auszuschließen. Für eine grundsätzliche Kartierung und Charakterisierung wurden die generierten Oberflächenproteinfraktionen mittels ein- oder zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung und Massenspektrometrie konnten insgesamt 75 verschiedene Proteine identifiziert werden. Des Weiteren wurden neue Virulenzfaktoren gesucht, die unter Kontrolle des zentralen Virulenzregulator PrfA stehen. Bei Vergleichen der differentiellen Genexpression verschiedener PrfA-Mutanten mit Proteomtechniken wurden vier putativ PrfA-abhängige Proteine identifiziert. Zwei Proteine fielen bei diesen ersten Analysen auf und wurden näher charakterisiert: das Protein P70 und das Protein Alp. Das P70 assoziiert bei einem Molekulargewicht von 70 kD stark mit dem bekannten Virulenzfaktor Internalin B und weist Homologien zu Autolysinen und N-Acetylmuramidase auf. Durch Vergleich der PrfA-Mutanten, Quantifizierung und Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass P70 nicht durch PrfA reguliert wird. Das Alp besitzt Homologien zu Adhäsinen sowie Bestandteilen von ABC-Transportern und gehört zu den putativ PrfA-regulierten Proteinen. Von beiden Proteinen wurden die Gen- und Proteinsequenzen genauer untersucht und für weitere Analysen poly- und monoklonale Antikörper dagegen hergestellt. Die jeweiligen Genbereiche wurden in Expressionsvektoren kloniert. Bei der Analyse der Gensequenz von Alp konnte sowohl eine putative Bindestelle für PrfA als auch für den Stressregulator SigB gefunden werden. Zur Klärung der Funktion von Alp wurde eine Deletionsmutante in Wachstums- und Infektionsversuchen genauer charakterisiert und in 2D-Gelen das veränderte Proteinprofil analysiert. Dabei konnten Hinweise für eine Komplementation der Deletion durch ähnliche Proteine gefunden werden, die auch die fehlenden Unterschiede im Phänotyp erklären. Die Funktion des Alps als Substrat-bindendes Lipoprotein in einem Metall-ABC-Transporter konnte durch biochemische Methoden nachgewiesen werden.

6. LITERATUR

- Aebersold, R.H., Teplow, D.B., Hood, L.E., Kent, S.B. (1986). Electrophoretic transfer of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence analysis. *J Biol Chem* 261, 4229-4238
- Alloush, H.M., Lopez-Ribot, J.L., Masten B.J., Chaffin W.L. (1997). 3-phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 321-30.
- Cordwell, S.J., Nouwens, A.S., Walsh, B.J. (2001). Comparative proteomics of bacterial pathogens. *Proteomics* 1, 461-472
- Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-86
- Beardsley, R.L., Karty, J.A., Reilly, J.P. (2000). Enhancing the intensities of lysine-terminated tryptic peptide ions in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14, 2147-53
- Bergmann, S., Rohde, M., Chatwal, G.S., Hammerschmidt, S. (2001). Alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol.* 40, 1273-87
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E. (1974). Methoden der enzymatischen Analyse. Band 1. Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- Bierne, H., Mazmanian, S.K., Trost, M., Pucciarelli, M.G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia-del Portillo, F., Schneeweind, O., Cossart, P. (2002). Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol* 43, 869-81
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6, 317-39
- Blomberg, A., Blomberg, L., Norbeck, J., Fey, S.J., Larsen, P.M., Larsen, M., Roepstorff, P., Degand, H., Boutry, M., Posch, A., et al. (1995). Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16, 1935-45
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99
- Boylan, S.A., Redfield, A.R., Brody, M.S., Price, C.W. (1993). Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 175, 7931-7.
- Boylan, S.A., Redfield, A.R., Price C.W. (1993). Transcription factor sigma B of *Bacillus subtilis* controls a large stationary-phase regulon. *J Bacteriol* 175, 3957-63

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Brancia, F.L., Oliver, S.G., Gaskell, S.J. (2000). Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14, 2070-3
- Braun L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., Cossart, P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* 25, 285-294
- Braun, L., Ghebrehiwet, B., Cossart, P. (2000). gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* 19, 1458-66
- Burnette-Curley, D., Wells, V., Viscount, H., Munro, C.L., Fenno, J.C., Fives-Taylor, P., Macrina F.L. (1995). FimA, a major virulence factor associated with *Streptococcus parasanguis* endocarditis. *Infect Immun* 63, 4669-74
- Cabanes, D. Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol* 10, 238-45
- Calandra, G.B., Cole, R.M. (1980). Lysis and protoplast formation of group B streptococci by mutanolysin. *Infect Immun* 28, 1033-7
- Camilli, A., Tilney, L.G., Portnoy, D.A. (1993). Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol* 8, 143-57.
- Chakraborty, T., Kathariou, S., Hacker, J., Hof, H., Huhle, B., Wagner, W., Kuhn, M., Goebel, W. (1987). Molecular analysis of bacterial cytolysins. *Rev Infect Dis* 9 Suppl 5, S456-66
- Chakraborty T., Goebel, W. (1988). Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microbiol Immunol* 138, 41-58
- Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C.J., Jockusch, B.M., Reinhardt, M., Walter, U. (1995). A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J* 14, 1314-21
- Dhar, G., Faull, K.F., Schneewind, O. (2000). Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* 39, 3725-33
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M., Chakraborty T. (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J* 11, 1981-90
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., Claverys, J.P. (1997). Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* 25, 727-39

- Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C., Cossart, P. (1993). Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. Mol Microbiol 9, 931-41
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InIB, a surface protein of the internalin multigene family. Mol Microbiol 16, 251-61.
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens P.L., Cossart, P. (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. Infect Immun 65, 1615-25
- Duche, O., Tremoulet, F., Namane, A., Labadie, J. (2002). A proteomic analysis of the salt stress response of *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett 215, 183-8
- Edman, P. Begg, G. (1967). A protein sequenator. Eur J Biochem 1, 80-92
- Emili, A.Q., Cagney, G. (2000). Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays. Nat Biotechnol 18, 393-7
- Engelbrecht, F., Dominguez-Bernal, G., Hess, J., Dickneite, C., Greiffenberg, L., Lampidis, R., Raffelsbauer, D., Daniels, J.J., Kreft, J., Kaufmann, S.H., Vazquez-Boland, J.A., Goebel, W. (1998). A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. Mol Microbiol 30, 405-17
- Fischetti, V.A., Pancholi, V., Schneeweind, O. (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anker region of surface proteins from gram-positive cocci. Mol Microbiol 4, 1603-1605
- Fischetti, V.A., Pancholi, V. (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. J Exp Med 176, 415-26
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M. et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. Rd. Science 269, 496-512
- Foster, S.J. (1992). Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. J Bacteriol 174, 464-470
- Fraser, K.R., Harvie, D., Coote, P.J., O'Byrne, C.P. (2000). Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 66, 4696-704
- Gaillard, J.-L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., Cossart, P. (1991). Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. Cell 65, 1127-1141.

- Gauss, C., Kalkum, M., Lowe, M., Lehrach, H., Klose, J. (1999). Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis* 20, 575-600
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., Berche, P. (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 55, 1641-6
- Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J.L., Lecroisey, A., Vazquez-Boland, J.A., Alouf, J.E., Berche, P. (1991). Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 59, 2382-8
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ohlsen, K., Hacker, J., Hecker, M. (1999). Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Gen Genet* 261, 558-66
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A.K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J., Hecker, M. (2000). Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182, 6983-91
- Gevart, K., Vandekerrckhove, J. (2000). Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21, 1145-1154
- Gharahdaghi, F., Weinberg, CR., Meagher, DA., Imai, BS., Mische, SM. (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601-605
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, KD., Fsihi, H., Portillo, FG., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, LM., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vincente, JM., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Dias, JC., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, JA., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P. . (2001). Comparative genomics of *Listeria species*. *Science* 26, 849-852
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1999). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-7
- Goldfine, H., Knob, C. (1992). Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect Immun* 60, 4059-67
- Görg, A., Postel, W., Domscheit, A., Gunther, S. (1988). Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis* 9, 681-92
- Görg, A., Obermaier C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-53

- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19, 1720-30
- Hebraud, M., Guzzo J. (2000). The main cold shock protein of *Listeria monocytogenes* belongs to the family of ferritin-like proteins. *FEMS Microbiol Lett* 190, 29-34
- Hecker, M., Schuhmann, W., Volker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19, 417-28
- Hecker, M., Volker, U. (1998). Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol* 29, 1129-36
- Hecker, M., Engelmann, S. (2000). Proteomics, DANN arrays and the analysis of still unknown regulons and unknown proteins of *Bacillus subtilis* and pathogenic gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* 290, 123-134
- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5011-5
- Jeffery, C.J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 8-11
- Jenkinson, H.F. (1992). Adherence, coaggregation, and hydrophobicity of *Streptococcus gordonii* associated with expression of cell surface lipoproteins. *Infect Immun* 60, 1225-8
- Jenkinson, H.F. (1994). Adherence and accumulation of oral streptococci. *Trends Microbiol* 2, 209-12
- Jensen, P.K., Pasa-Tolic, L., Peden, K.K., Martinovic, S., Lipton, M.S., Anderson, G.A., Tolic, N., Wong, K.K., Smith, R.D. (2000). Mass spectrometric detection for capillary isoelectric focusing separations of complex protein mixtures. *Electrophoresis* 21, 1372-80
- Joris, B., Englebert, S., Chu, C.P., Kariyama, R., Daneo-Moore, L., Shockman, G.D., Ghuysen, J.M. (1992). Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. *FEMS Microbiol Lett* 70, 257-64
- Jungblut, PR. (2001). Proteome analysis of bacterial pathogens. *Microbes Infect* 3, 831-840
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., Cossart, P. (1992). L. monocytogenes-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68, 521-31
- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Baker, R.A., Jenkinson, H.F. The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake. *J Bacteriol* 180, 290-5
- Kuchler, K. (1993). Unusual routes of protein secretion: the easy way out. *Tr. Cell Biol.* 3, 421-425

Kusssmann, M., Roepstorff, P. (2000). Sample preparation techniques for peptides and proteins analyzed by MALDI-MS. *Methods Mol Biol* 146, 405-424

Laemmli, U.K.(1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissole, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., Szustakowski, J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J.

Initial sequencing and analysis of the human genome. (2001). *Nature* 409, 860-921

Lawrence, M.C., Pilling, P.A., Epa, V.C., Berry, A.M., Ogunniyi, A.D., Paton, J.C. (1998). The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein. *Structure* 6, 1553-61

- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., Chakraborty, T. (1991). Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad USA* 87, 8336-8340
- Lingau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., Chakraborty, T. (1995). Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun* 63, 3896-3903
- Liu, S., Graham, J.E., Bigelow, L., Morse, P.D. 2nd, Wilkinson, B.J. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 68, 1697-705.
- Loessner, M.J., Schneider, A., Scherer, S. (1996). Modified *Listeria* bacteriophage lysin genes (*ply*) allow efficient overexpression and one-step purification of biochemically active fusion proteins. *Appl Environ Microbiol* 62, 3057-60
- Lopez, L.F., Barry, P., Sawlivich, W.B., Hines, T., Skea, W.M. (1994). High resolution 2-D peptide mapping with subsequent analysis of peptides by microsequencing or lectin binding directly from PVDF membrane blots. *Appl Theor Electrophor* 4, 95-102
- Lottenberg, R., Broder, C.C., Boyle, M.D., Kain, S.J., Schroeder, B.L., Curtiss, R. 3rd. (1992). Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J Bacteriol* 174, 5204-10
- Lottspeich, F. (1999). Proteome analysis: A pathway to the functional analysis of proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 38, 2476-2492
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.A., Milon, G., Cossart, P. (1991). Pleiotrophic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* 5, 2273-2283
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor of internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84, 923-932
- Merchante, R., Pooley, H.M., Karamata, D. (1995). A periplasm in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177, 6176-83
- Mishu, B., Koehler, J., Lee, L.A., Rodrigue, D., Brenner, F.H., Blake, P., Tauxe, R.V. (1994). Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States, 1985-1991. *J Infect Dis* 169, 547-52
- Modun, B., Williams, P. (1999). The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* 67, 1086-92
- Mogilner, A., Oster, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J* 71, 3030-3045

- Mueller, S., Hain, T., Pashalidis, P., Lingau, A., Domann, E., Chakraborty, T., Wehland, J. (1998). Purification of the *inlB* gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect Immun* 66, 3128
- Nadon, C.A., Bowen, B.M., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2002). Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 70, 3948-3952
- Nannapaneni, R., Story, R., Bhunia, A.K., Johnson, M.G. (1998). Unstable expression and thermal instability of a species-specific cell surface epitope associated with a 66-kilodalton antigen recognized by monoclonal antibody EM-7G1 within serotypes of *Listeria monocytogenes* grown in nonselective and selective broths. *Appl Environ Microbiol* 64, 3070-4
- Navarre, W.W., Ton-That, H., Faull, K.F., Schneewind, O. (1998). Anchor structure of staphylococcal surface proteins. II. CooH-terminal structure of muramidase and amidase-solubilized surface protein. *J Biol Chem* 273, 29135-42
- Navarre, W.W., Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 174-229
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-62
- Oetjen, J., Fives-Taylor, P., Froeliger, E.H. (2002). The divergently transcribed *Streptococcus parasanguis* virulence-associated *fimA* operon encoding an Mn(2+)-responsive metal transporter and *pepO* encoding a zinc metallopeptidase are not coordinately regulated. *Infect Immun* 70, 5706-14
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021
- Osaki, M., Takamatsu, D., Shimoji, Y., Sekizaki, T. (2002). Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 184, 971-82
- Pancholi, V., Fischetti, V.A. (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* 176, 415-26
- Pancholi, V., Fischetti, V.A. (1998). Alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem*. 1998 Jun 5;273(23):14503-15.
- Parida, S.K., Domann, E., Rohde M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., Chakraborty, T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* 28, 81-93
- Petersohn, A., Bernhardt, J., Gerth, U., Hoper, D., Koburger, T., Volker, U., Hecker, M. (1999). Identification of sigma(B)-dependent genes in *Bacillus subtilis* using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. *J Bacteriol* 181, 5718-24

- Phan-Thanh, L., Gormon, T. (1995). Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 16, 444-50
- Phan-Thanh, L., Gormon, T. (1997). Stress proteins in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis* 18, 1464-71
- Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W., Cossart, P. (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* 60, 1263-1267
- Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I., Berche, P. (1993). The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 61, 1576-80
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., Johnson, E.A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 57, 3046-8
- Que, Q., Helmann, J.D. (2000). Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol Microbiol* 35, 1454-68
- Rabilloud, T., Valette, C., Lawrence J.J. (1994). Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 15, 1552-1558
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Dorsselaer, A., Lunardi, J. (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1, 699-704
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S.H., Goebel, W. (1998). The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* 260, 144-58
- Righetti, P.G. (1990). Immobilized pH gradients. Theory and methodology. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford
- Rosenkrands, I., Weldingh, K., Jacobsen, S., Hansen, C.V., Florio, W., Gianetri, I., Andersen, P. (2000). Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* 21, 935-48
- Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud T. (2000). Membrane proteins and proteomics: un amour impossible. *Electrophoresis* 21, 1054-1070
- Sanwal, B.D., Smando, R. (1969). Malic enzyme of *Escherichia coli*. Diversity of the effectors controlling enzyme activity. *J Biol Chem* 244, 1817-23
- Schägger, H., von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-31

Schmitt, M.P., Holmes, R.K. (1991). Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in *C. diphtheriae* C7 strains. *Infect Immun* 59, 1899-904

Schmitt, M.P., Holmes, R.K. (1993). Analysis of diphtheria toxin repressor-operator interactions and characterization of a mutant repressor with decreased binding activity for divalent metals. *Mol Microbiol.* 1993 Jul;9(1):173-81.

Schneeweind, O., Model, P., Fischetti, V.A. (1992). Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell* 70, 267-281

Schwarzkopf, A. (1996). *Listeria monocytogenes*—aspects of pathogenicity. *Pathol Biol* 44, 769-774

Tilney, L.G., Portnoy, D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109, 1597-1608

Shen, Y., Berger, S.J., Smith, R.D. (2000). Capillary isoelectric focusing of yeast cells. *Anal Chem* 72, 4603-7

Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T., Cossart, P. (1995). Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J Bacteriol* 177, 6469-76

Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., Schnitzler, N., Luticken, R., Podbielski, A. (1999). Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun* 1999 67, 871-8

Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B., Kung, C. (1997). Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Annu Rev Physiol* 59, 633-57

Tao, X., Murphy, J.R. (1992). Binding of the metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria tox operator requires a divalent heavy metal ion and protects the palindromic sequence from DNase I digestion. *J Biol Chem* 267, 21761-4

Tilney, L.G., Portnoy, D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109, 1597-608

Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G., Varshavsky, A. (1991). The N-end rule in bacteria. *Science* 254, 1374-7

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4

Vazquez, Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, Ohayon, H., Geoffrey, C., Mengaud, J., Cossart, P. (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* 60, 219-30

Vazquez-Boland, Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14, 584-640

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-51

Vesanto, E., Varmanen, P., Stelle, J.L., Palva, A. (1994). Characterization and expression of the *Lactobacillus helveticus pepC* gene encoding a general aminopeptidase. *Eur J Biochem* 224, 991-7

Volker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Volker, A., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M. (1994). Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140, 741-52

Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., Humphery-Smith, I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-4

Whisstock, J.C., Lesk, A.M. (1999). SH3 domains in prokaryotes. Trends Biochem Sci 24, 132-3

Wilkins, MR., Pasquali, C., Appel, RD., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, JC., Yan, JX., Gooley, AA., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., Humphery-Smith, I. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev 13, 19-50

Yates, J.R. 3rd, Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T. (1993). Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. Anal Biochem 214, 397-408

Yother, J., White, J.M. (1994). Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. J Bacteriol 176, 2976-85

7. DANKSAGUNG

Prof. Dr. Jürgen Wehland möchte ich herzlich für das interessante Thema dieser Arbeit danken. Besonderer Dank geht an Dr. Uwe Kärst für die Betreuung dieser Arbeit und weil er bei allen Fragen und technischen Problemen stets zur Stelle war.

Außerdem danke ich Prof. Dr. G. Singh Chhatwal für die Übernahme des Koreferats.

Ein Extra-Dankeschön an Dr. Lothar Jänsch für die Hilfestellungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Auch bei den anderen Proteomikern Dr. Sandra Pilawa, Dr. Josef Wissing, Robert Brehm, Jaqueline Majewski, Andrea Harms, Reiner Munder, Matthias Trost, Kathrin Thedieck und Dr. Oliver Diekmann, möchte ich mich für die Zusammenarbeit und den konstruktiven Gedankenaustausch bedanken. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Dr. Dirk Wehmhöner und Maja Baumgärtner, auf deren Unterstützung und Aufmunterungen ich inner- und auch außerhalb des Labors immer zählen konnte. Der ehemaligen Besatzung von A2.11: Sascha Pust, Tobias Sperka, Dr. Christian Erck, Dr. Marcus Geese und Dominik Sieblitz, vielen Dank für den Spaß im Labor!

Des Weiteren gilt mein Dank allen MitarbeiterInnen der Abteilung Zellbiologie in der GBF; vor allem an Petra Hagendorff, Marlies Konrad und Amanda Mühlmann ein großes Dankeschön für die unglaubliche Geduld, die zahlreichen Hilfen und wertvollen Tipps. Dr. Thres Stradal und Dr. Matthias Machner danke ich für die Hilfe bei meinen molekularbiologischen Versuchen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Steffi Benesch, die mir bei allen dienstlichen und privaten Problemchen zugehört und geholfen hat und für die fantastischen Skiurlaube.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Manfred Nimtz und Andrea Tiepold aus der Strukturforschung der GBF für die produktiven Gespräche und Hilfe bei allen massenspektrometrischen Geschichten. Bei Rita Getzlaff möchte ich mich für die vielen N-terminalen Sequenzierungen bedanken. Der Arbeitsgruppe MERCK an der GBF danke ich für die Herstellung der Peptide.

Ein weiteres Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Trinad Chakraborty an der Universität Giessen. Besonders Dr. Torsten Hain und Sandra Wagner möchte ich aufgrund der Kooperation und der Herstellung der Deletionsmutante danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Oma, die mich immer unterstützen und an mich glauben.

8. ANHANG

Tabelle 8.1: Übersicht aller in dieser Arbeit identifizierten Proteine: Die erste Spalte (Gen) gibt die die Nummer des Gens aus der Genomdatenbank an, die zweite Spalte (Name) den zusätzlichen Namen des Gens, wenn vorhanden, die vierte Spalte (Kat.) die funktionelle Gruppe des Gens nach der Einteilung von Glaser *et al.* (2001), die fünfte Spalte (SP) gibt Auskunft über das Vorhandensein eines Signalpeptids in der Sequenz und die sechste Spalte über die Art der Zellwandassoziation soweit sie bekannt ist.

Gen	Name	Vorhergesagte Funktion	Kat.	SP	Zellwandassoziation
<i>lmo0013</i>	<i>goxA</i>	Quinoloxidase Untereinheit II	1.4	Ja	Lipoprotein
<i>lmo0047</i>		Unbekannt	5.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo0135</i>		Oligopeptid-Bindeprotein (ABC-Transporter), AppA	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo0197</i>		Sporulationsprotein G	1.7	Nein	
<i>lmo0201</i>	<i>plcA</i>	Phosphoinositol-spezifische Phospholipase C	2.4	Ja	Sekretiert
<i>lmo0202</i>	<i>hly</i>	Listeriolysin	4.5	Ja	Sekretiert
<i>lmo0204</i>	<i>actA</i>	Aktin-Nukleationsfaktor	1.8	Ja	Hydrophober C-Term.
<i>lmo0210</i>	<i>ldh</i>	L-Lactatdehydrogenase	2.1.1	Nein	
<i>lmo0214</i>	<i>mfd</i>	Transkriptionsreparatur Couplingfaktor	3.2	Nein	
<i>lmo0223</i>	<i>cysK</i>	Cysteinsynthase	2.2	Nein	
<i>lmo0285</i>		Lipoprotein	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo0292</i>		Hitzeschockprotein HtrA, Serinprotease	4.1	Nein	
<i>lmo0434</i>	<i>inlB</i>	Internalin B	1.8	Ja	GW-Modul
<i>lmo0443</i>	<i>lytR</i>	Transkriptionsregulator	3.5.2	Ja	
<i>lmo0541</i>		ABC-Transporter, ferrichrom, Lipoprotein	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo0582</i>	<i>iap</i>	Invasion-assoziiertes Protein	1.1	Ja	P60-ähnli. Protein
<i>lmo0739</i>		6-Phosphobetaglucosidase	2.1.1	Nein	
<i>lmo0791</i>		Unbekannt	5.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo0904</i>		Unbekannt	6	Nein	
<i>lmo0913</i>		Succinatsemialdehyddehydrogenase	2.1.1	Nein	
<i>lmo0950</i>		Unbekannt	5.2	Ja	
<i>lmo0978</i>		Aminosäure Aminotransferase	2.2	Nein	
<i>lmo1011</i>		Tetrahydrodipicolinatsuccinylase	2.2	Nein	
<i>lmo1041</i>		ABC-Transporter, Molybdat Bindeprotein	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1053</i>	<i>pdhB</i>	Pyruvatdehydrogenase-Komplex	2.1.2	Nein	
<i>lmo1054</i>	<i>pdhC</i>	Pyruvatdehydrogenase-Komplex	2.1.2	Nein	
<i>lmo1055</i>	<i>pdhD</i>	Pyruvatdehydrogenase-Komplex	2.1.2	Nein	
<i>lmo1059</i>		Unbekannt	6	Ja	
<i>lmo1068</i>		Unbekannt	6	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1073</i>		Metallionenbindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1082</i>		dTDP-Zuckerepimerase	1.1	Ja	
<i>lmo1083</i>		dTDP-D-Glucose 4, 6-Dehydrase	1.1	Ja	
<i>lmo1086</i>		CDP-Ribitolpyrophosphorylase	2.1	Nein	
<i>lmo1291</i>		Acyltransferase	1.1	Nein	transmembran
<i>lmo1314</i>	<i>frr</i>	Ribosomrecyclingfaktor	3.7.5	Nein	
<i>lmo1388</i>	<i>tcsA</i>	T-Zell-stimulierendes Antigen	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1426</i>	<i>opuCC</i>	Osmoprotectant-Bindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1439</i>	<i>sod</i>	Superoxiddismutase	4.2	Nein	
<i>lmo1473</i>	<i>dnaK</i>	Chaperonprotein	3.9	Nein	
<i>lmo1571</i>	<i>pfk</i>	6-Phosphofructokinase	2.1.1	Nein	
<i>lmo1583</i>		Thiolperoxidase	4.2	Nein	
<i>lmo1634</i>		Alkoholacetaldehyddehydrogenase	2.1.1	Nein	

<i>lmo1657</i>	<i>tsf</i>	Translations-Elongationsfaktor	3.5.3	Nein	
<i>lmo1671</i>		Adhäsions/Lipoprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1673</i>	<i>menB</i>	Dihydroxynaphtonsäuresynthase	2.5	Nein	
<i>lmo1730</i>		Zuckerbindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1738</i>		Aminosäuerbindeprotein ABP (ABC Transporter)	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1757</i>		Unbekannt	5.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1847</i>		Alp, Metallionenbindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo1445</i>	<i>zurR</i>	Transkriptionsregulator	3.5.2	Nein	
<i>lmo1967</i>		Resistenzprotein für toxische Ionen	4.2	Nein	
<i>lmo2021</i>		Unbekannt	5.2	Nein	
<i>lmo2068</i>	<i>groEL</i>	Chaperonin	3.9	Nein	
<i>lmo2069</i>	<i>groES</i>	Chaperonin	3.9	Nein	
<i>lmo2101</i>		Enzym der Pyridoxinsynthese	2.5	Nein	
<i>lmo2219</i>		Proteinexport Protein PrsA	1.6	Ja	Lipoprotein
<i>lmo2331</i>		gp32, Bacteriophage A118 protein	4.4	Ja	Lipoprotein
<i>lmo2415</i>		ATP-bindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Nein	
<i>lmo2417</i>		Lipo/Bindeprotein (ABC Transporter)	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo2425</i>		Glycinspaltungssystem Protein H	2.2	Nein	
<i>lmo2431</i>		ABC-Transporter, ferrichrom, Bindeprotein	1.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo2455</i>	<i>eno</i>	Enolase	2.1.2	Nein	
<i>lmo2456</i>	<i>pgm</i>	Phosphoglyceratmutase	2.1.2	Nein	
<i>lmo2458</i>	<i>pgk</i>	Phosphoglyceratkinase	2.1.2	Nein	
<i>lmo2459</i>	<i>gap</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase	2.1.2	Nein	
<i>lmo2505</i>	<i>spl</i>	Peptidoglycan-lytisches Protein P45	1.1	Ja	P60-ähnl. Protein
<i>lmo2511</i>		Konserviertes, hypothetisches Protein	5.2	Nein	
<i>lmo2556</i>	<i>fbaA</i>	Fructose1,6-bisphosphataldolase	2.1.1	Nein	
<i>lmo2558</i>	<i>ami</i>	Amidase, Autolysin	1.8	Ja	GW-Modul
<i>lmo2636</i>		Lipoprotein	5.2	Ja	Lipoprotein
<i>lmo2637</i>		Lipoprotein	1.8	Ja	Lipoprotein
<i>lmo2653</i>	<i>tufA</i>	Translation Elongationsfaktor	3.7.4	Nein	
<i>lmo2654</i>	<i>fus</i>	Elongationsfaktor G	3.7.4	Nein	
<i>lmo2691</i>		Autolysin, N-Acetylmuramidase	1.1	Ja	
<i>lmo2714</i>		Quecksilber-Reduktase, LPXTG Motiv	1.8	Ja	LPXTG-Motiv